

## Tesis de Posgrado

# Mecanismos no convencionales de regulación tiroidea

Juvenal, Guillermo Juan

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Juvenal, Guillermo Juan. (1983). Mecanismos no convencionales de regulación tiroidea. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1802\\_Juvenal.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1802_Juvenal.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Juvenal, Guillermo Juan. "Mecanismos no convencionales de regulación tiroidea". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1802\\_Juvenal.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1802_Juvenal.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMOS NO CONVENCIONALES DE  
REGULACION TIROIDEA

Autor: Guillermo Juan JUVENAL

Director de Tesis: Dr. Mario Alberto PISAREV

Lugar de Trabajo: División Bioquímica Nuclear  
Comisión Nacional de Energía Atómica

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS



1802  
Ej. 2

Septiembre, 1983.

A MIS PADRES

La naturaleza tiene perfecciones para demostrar que ella es la imagen de Dios, y defectos para mostrar que es solamente eso: su imagen.

Blas Pascal (1623-1662)

## AGRADECIMIENTOS

- Un sincero agradecimiento al Dr. Mario A. Pisarev quien me inició en las tareas de investigación, brindándome en todo momento sus conocimientos y confianza.
- A los profesionales que participaron en este trabajo: Dr. D.P. Cardinali; Dra. M. Barantoni (determinación de catecolaminas); Dr. R. Boado (radioinmunoensayos de  $T_3$ , TSH); Lic. G. Chazenbalk; Dra. D. Kleiman de Pisarev; Dr. L. Krawiec; Dra. M.J. Vacas (determinación de adrenoreceptores).
- A mis compañeros de laboratorio, a la Sra. C. Herrera de Ocaranza y al Sr. O. Pennella por sus espontáneas colaboraciones.
- A la Dra. A. Aragonés, consejera de estudios; al Dr. C. Enriori por la determinación de yodo y al Dr. J.C. Calvo por la realización de algunos cálculos estadísticos.
- Al Dr. N. Altschuler y a las autoridades de la Comisión Nacional de Energía Atómica por permitirme la realización de esta tesis.
- A los laboratorios que facilitaron el uso de diversos equipos: Instituto de Biología y Medicina Experimental; Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales; Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación Campomar; División Procesos y División Radiofármacos de la C.N.E.A.

- A la Sra. Elisa de Di Carlo por la dactilografía de esta tesis.
- Al personal de Biblioteca de la C.N.E.A.; del Instituto de Biología y Medicina Experimental y del Instituto de Investigaciones Bioquímicas.
- A la División Proyectos y Fotografía de la C.N.E.A.
- A la Sección Imprenta de la C.N.E.A.
- Al personal administrativo, de fotocopias y mantenimiento de la C.N.E.A.
- A los Frigoríficos Gaucán, Cocarsa y El Faraón por la donación de las tiroides bovinas.
- Al personal del bioterio de la C.N.E.A. y de CEFAPRIM.
- Al Rotary Club, de Vicente López, por la beca concedida para la realización de mis estudios universitarios.
- A mis profesores y maestros.
- A todos los que de alguna forma contribuyeron para la realización de esta tesis.

# Í N D I C E

## Páginas

### 1. INTRODUCCION

1. <u>Reseña Histórica</u> .....	1
Descubrimiento del yodo .....	4
Descubrimiento del yodo en la tiroides .....	5
Regulación de la glándula tiroides .....	7
2. <u>Síntesis de las Hormonas Tiroideas</u> ....	10
a). Captación.....	10
b). Síntesis de la tiroglobulina.....	12
c). Mecanismo de yodinación.....	13
d). Formación de las yodotironinas....	14
e). Almacenamiento y secreción.....	15

### 3. Regulación

3.1. <u>Tirotrofina</u> .....	17
Acciones de la TSH .....	21
a). Metabolismo del yodo.....	21
b). Metabolismo de carbohidratos.....	24
c). Metabolismo de lípidos .....	24
d). Metabolismo de las proteínas.....	25
e). Metabolismo de ácidos nucleícos .....	26
3.2. <u>Prostaglandinas</u> .....	29
3.3. <u>Sistema <math>Ca^{2+}</math> - GMPC</u> .....	33
3.4. <u>Sistema Nervioso Parasimpático</u> .....	36

3.5. Sistema Simpático .....	37
Efectos funcionales .....	38
3.6. Autorregulación Tiroidea .....	46
a). Transporte y organificación del yodo .....	47
b). Secreción de hormonas tiroideas .....	53
c). Sistema adenilatociclasa-AMPC .....	57
d). Metabolismo intermedio .....	60
e). Crecimiento y diferenciación .....	63
3.7. Otros Factores de Regulación .....	67
4. <u>Objetivos de los Presentes Trabajos</u> .....	71

## II. MATERIALES Y METODOS

1. Experimentos realizados con Ratas .....	74
1.1. Tratamientos efectuados .....	74
a). Gangliectomía cervical superior.....	74
b). Pinealectomía .....	75
c). Inducción del bocio .....	75
1.2. Determinación de hormonas y catecolaminas .....	76
a). Hormonas tiroideas en sangre.....	76
b). Determinación de los niveles séricos de TSH .....	76
c). Determinación de catecolaminas endógenas .....	77
d). Contenido endógeno de hormonas tiroideas .....	78
1.3. Captación de $^{86}\text{Rb}$ .....	78



1.4. Incorporación de $^3\text{H}$ -uridina al ARN tiroideo .....	79
1.5. Receptores adrenérgicos $\alpha$ y $\beta$ .....	80
1.6. Captación de $^{131}\text{I}$ .....	82
1.7. Metabolismo de $^{125}\text{I}$ .....	83
1.8. Análisis estadístico de los datos ..	83
 2. <u>Experimentos realizados con</u> <u>Tiroides Bovinas</u> .....	 84
2.1. Obtención del tejido .....	84
2.2. Composición del medio de incubación .....	84
2.3. Condiciones de incubación .....	84
2.4. Incorporación de $^3\text{H}$ -uridina a ARN tiroideo .....	85
2.5. Captación de $^{125}\text{I-T}_3$ por cortes de tiroides .....	85
2.6. Metabolismo de $^{125}\text{I-T}_3$ en cortes de tiroides .....	86
2.7. Distribución subcelular de la $^{125}\text{I-T}_3$ .....	87
2.8. Presencia de productos yodados en núcleos de tiroides a partir de $^{125}\text{I}$ .....	88
2.9. Unión de $^{125}\text{I-T}_3$ a núcleos aislados .....	89
a). Obtención de los núcleos .....	89

b). Determinación de la constante de asociación y del número de sitios de unión para triyodotironina en núcleos de tiroides .....	90
c). Efectos de la acción enzimática.....	91
d). Obtención de extractos nucleares.....	91
e). Filtración en gel del extracto nuclear .....	92
2.10. Otras determinaciones .....	93
2.11. Análisis estadísticos de los datos....	93
3. <u>Reactivos utilizados</u> .....	94

### III. RESULTADOS

1.1. Relación entre estructura y actividad biológica de yodocompuestos .....	96
1.2. Influencia del PTU y del MMI sobre la acción de $T_3$ y $T_4$ .....	96
1.3. Importancia del contenido tiroideo de yodo en la modulación de la respuesta al yodo exógeno .....	99
1.4. Metabolismo de $^{125}I-T_3$ por cortes de tiroides .....	99
1.5. Entrada de la triyodotironina a la célula .....	102
1.6. Efecto del pH sobre la entrada de la $^{125}I-T_3$ .....	105
1.7. Distribución subcelular de la $^{125}I-T_3$ .....	110
1.8. Presencia de productos yodados en núcleos de tiroides a partir de $^{125}I$ ..	110

1.9. Unión de la $^{125}\text{I-T}_3$ a núcelos purificados .....	116
1.10. Efectos de las enzimas en la unión de $^{125}\text{I-T}_3$ a núcleos aislados .....	116
1.11. Caracterización de los sitios de unión nucleares para triyodotironina .....	116
1.12. Solubilización parcial del receptor .....	121
2.1. Efectos de la gangliectomía crónica sobre la función tiroidea	
2.1.1. Efectos de la Gx bilateral sobre la respuesta bociógena al MMI .....	125
2.1.2. Efectos de la pinealectomía sobre la respuesta bociógena al MMI .....	129
2.1.3. Efectos de la Gx bilateral sobre la respuesta bociógena al TSH .....	129
2.1.4. Efectos de la Gx bilateral sobre la síntesis de ARN .....	129
2.1.5. Efectos de la Gx bilateral sobre la captación de $^{86}\text{Rb}$ por las glándulas tiroides y pineal .....	132
2.1.6. Efectos de la Gx bilateral sobre el contenido endógeno de norepinefrina, epinefrina y dopamina de la glándula tiroides .....	132
2.1.7. Efectos de la Gx bilateral en los $\alpha$ y $\beta$ adrenoreceptores tiroideos .....	136

2.1.8. Niveles de norepinefrina y epinefrina en ambas hemitiroides luego de la Gx unilateral derecha .....	139
2.1.9. Bocio espontáneo e inducido por MMI en ratas sometidas a Gx unilateral .....	139
2.1.10. Contenido de $T_3$ y de $T_4$ en lóbulos tiroideos luego de la $^4Gx$ unilateral derecha .....	142
2.1.11. Metabolismo de $^{125}I$ en lóbulos tiroi- deos luego de la Gx unilateral derecha .....	142
2.2. Efectos de la gangliectomía aguda sobre la función tiroidea .....	142
2.2.1. Efecto de la Gx aguda sobre el contenido tiroideo de norepinefrina .....	142
2.2.2. Efecto de la Gx aguda sobre el eje hipofiso-tiroideo .....	147
2.2.3. Participación de la glándula pineal en los efectos de la Gx aguda .....	150
2.2.4. Flujo sanguíneo en el territorio del GCS durante la Gx aguda .....	152
IV. <u>DISCUSION</u> .....	154
V. <u>CONCLUSIONES</u> .....	181
VI. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u> .....	184

AC	Adenilato ciclasa.
Act. Esp.	Actividad específica.
ADN	Acido deoxirribonucleico
AMPc	Adenosín 3'5' monofosfato cíclico.
db AMPc	Dibutiril adenosín 3'5' monofosfato cíclico.
APC	Acido perclórico.
ARN	Acido ribonucleico.
ATA	Acido tricloroacético.
ATP	Adenosín 5' trifosfato.
BAA	Butanol-ácido acético-agua.
BEA	Butanol-etanol-amonio hidróxido.
BSA	Albúmina de suero bovino
$\mu$ Ci	Micro Curie.
CMPC	Citidín 3'5' monofosfato cíclico.
COMT	Catecol-O-metil transferasa.
cpm	Cuentas por minuto.
DA	Dopamina
DHA	Dihidroalprenolol.
DHE	Dihidroergocriptina.
DIMIT	L-3,5 dimetil 3' isopropil tironina.
DISBT	L-3,5 dimetil 3'sec butiltironina.
DIT	Diyodotirosina.
DNasa	Deoxirribonucleasa.
DNY	Dieta con contenido normal en yodo.
dpm	Desintegraciones por minuto.

DPY	Dieta pobre en yodo.
DRY	Dieta rica en yodo.
DTT	Ditiotreitol.
E	Epinefrina.
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
f mol	Fentomol.
GCS	Gangliocervical superior.
GMPC	Guanosin 3'5' monofosfato cíclico.
db GMPC	Dibutiril guanosin 3'5' monofosfato cíclico.
Gx	Gangliectomía.
HAA	Hexano-amílico terciario-amonio.
KRB	Solución de Krebs-Ringer-bicarbonato.
μl	Microlitro.
M	Molar.
Mg	Miligramo.
MIT	Monoyodotirosina.
ml	Mililitro.
MMI	Metil mercaptoimidazol.
NE	Norepinefrina.
ng	Nanogramo.
nM	Nanometro.
nmol	Nanomol.
PBI	Yodo unido a proteínas.
pg	Picogramo.
PG	Prostaglandina.
pmol	Picomol.
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo.
PTU	Propiltiouracilo.

Px	Pinealectomía.
RNasa	Ribonucleasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SAM	5-adenosil-1-metionina.
SNC	Sistema nervioso central.
T <sub>2</sub>	L-3-5 diyodotironina.
T <sub>3</sub>	L-3,5,3' triyodotironina.
T <sub>3</sub> <sup>r</sup>	L-3,5',3' triyodotironina.
T <sub>4</sub>	Tiroxina o tetrayodotironina.
Tetrac	Acido tetrayodotiroacético.
Tetraprop	Acido tetrayodopropiónico.
T <sub>g</sub>	Tiroglobulina.
T/M	<u>cpm tiroides/g de peso tiroideo</u> cpm medio/ml medio
Triac	Acido triyodotiroacético
Triprop	Acido triyodotiropropiónico
Tris	Tri (hidroxi metil amino metano)
T/S	<u>cpm tiroides/g de peso tiroideo</u> cpm suero/ml de suero
TSH	Tirotrofina.

## I N T R O D U C C I O N



## 1. RESEÑA HISTORICA

Cuando en 1656 Wharton utiliza el término "tiroides" (del griego *θυρεός* : escudo y *είδος* : semejanza; que tiene la forma de escudo) para designar la glándula, su función no estaba establecida y un crecimiento moderado de la misma era considerado como signo de belleza estética. Sin embargo, desórdenes de la glándula como por ejemplo el bocio, son conocidos desde épocas remotas. El término "bocio" etimológicamente proviene del bajo latín: bocio, bocium y a su vez del céltico bos, bosen: tumor. Antiguamente también se utilizaba el término broncocele y estruma para designar al bocio y a todo tumor de cuello.

Desde un primer momento se asoció al bocio con factores ambientales, relacionándolo con la situación geográfica.

En Grecia, Hipócrates de Cos escribe, en su "Tratado de los Aires, las Aguas y los Lugares" sobre las condiciones bociógenas de ciertas fuentes. Aristóteles, Celso, Galeno y Plinio también compartían estas ideas. Fue justamente en la época de Galeno que la tiroides era considerada lubricante de la laringe. Vitrubio sostenía que el bocio provenía de ciertas condiciones del agua de bebida.

Los médicos hipocráticos usaban plantas medicinales yodíferas, especialmente el berro, para el tratamiento del bocio.

Plinio (23-79) prescribe contra el bocio la raspadura diaria con una espina de pescado, en su obra "Historia Natural".

Discorides utilizaba la "Phycos Thalassion", una planta de propiedades análogas a las del berro. Rogelio de Salerno (1770) recomendaba el uso de esponja quemada para el tratamiento del bocio, al igual que Arnodeo de Villanova, médico, filósofo y alquimista de la Escuela de Medicina en Montpellier.

Paracelso (1493-1541) recetaba hierro, azufre, mercurio y aguas minerales. Descubrió que las aguas de Siebenburgen (Transilvania) tenían acción benéfica contra el bocio.

La escuela de Salerno, en sus obras "Herbario" y "Passionarius Galeni" también recomendaban el uso de cenizas de esponja, preconizado por Rolando de Parma y Guglielmo de Saniceto. Marco Polo habla del bocio en Europa y de sus relaciones con el agua en sus "Viajes", en el año 1261.

En la medicina china también existen evidencias del tratamiento del bocio, hace unos 2000 años. A los cretinos los alimentaban con tiroides de carnero. Los espíritus malignos que se encontraban alojados en el cuello los ahuyentaban recetando cenizas de esponja quemada. Se prescribieron también algas marinas secas y pulverizadas, mezcladas con miel. Fue Li Shi Chen (Siglo XVI), autor del "Pen Tsáo Kang Mu" (Pen Ts'ao, libro de las hierbas) quien comenzó con esa práctica.

En los libros árabes del Siglo XIV hay descripciones de hinchazones del cuello que ellos relacionaban con la astrología. Vinculaban las enfermedades con los signos zodiacales donde Capricornio estaba relacionado con los del cuello.

El bocio exoftálmico es descripto por los oculistas franceses Saint Ives, Bronsquet, Bellanger y Demones.

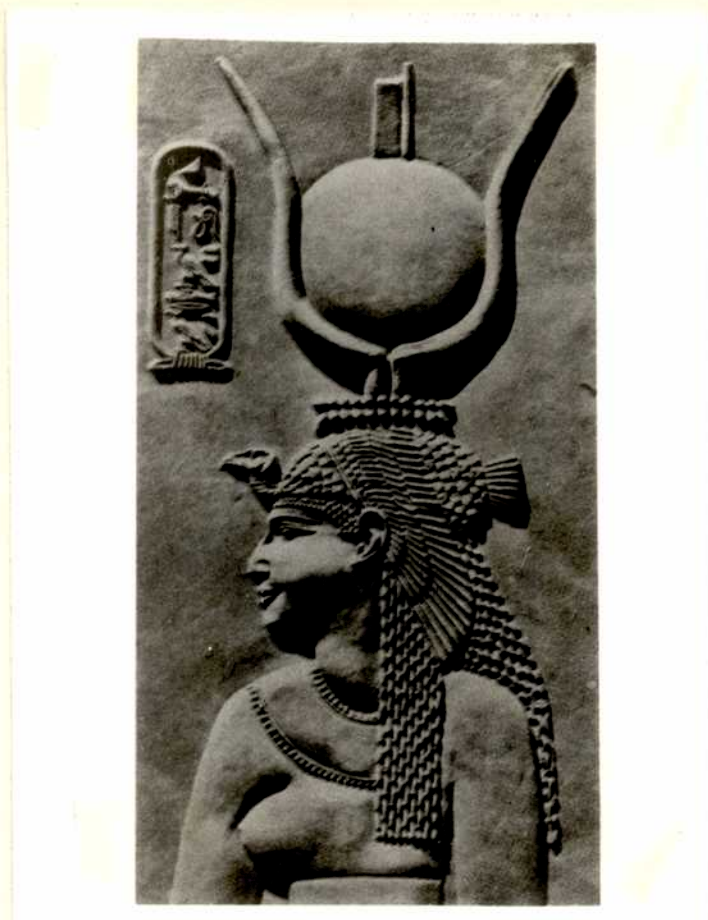


FIGURA 1

GRABADO ANTIGUO MOSTRANDO A CLEOPATRA  
CON UN BOCIO

En 1786 Caleb Hillier hizo una descripción más detallada, al igual que el italiano José Flaiani, R. Graves y G. Stokes. Evin Basedow (1840) describió cuatro casos con las características de esta enfermedad: bocio, exoftalmia y palpitaciones con taquicardia.

#### Descubrimiento del yodo:

Hacia el fin de las Guerras Napoleónicas hubo escasez de nitrato en Francia, utilizado en la producción de pólvora. Parte del proceso en la obtención de sal de mesa involucraba la descomposición del nitrato de calcio por extractos de cenizas de madera. En 1812 Bernard Courtois, un salitre-ro de París, sustituyó las cenizas de madera por algas quemadas, con el inconveniente de que sus recipientes de cobre sufrían serias erosiones. Con la ayuda de dos químicos: Clément y Desormes, Courtois encontró que el agente responsable era un compuesto brillante de color violeta que sublimaba con el calentamiento. Gay Lussac, en 1814 fue quien le dio el nombre de yodo (del griego *ἰώδης*: violado).

En 1820 Coindet, un médico genovés, sospechando que las cenizas de esponja que eran utilizadas como remedio contra el bocio podrían contener yodo, comenzó a tratar a sus pacientes bociosos con yodo, ya sea como solución de yoduro de potasio o como tintura en alcohol. Tuvo éxito en el tratamiento, observando una disminución del tamaño del bocio. Sin embargo, luego de unos ciento cincuenta casos, Coindet observó el riesgo de toxicidad de la administración de yodo en grandes cantidades.

Su tratamiento fue rápidamente aceptado y utilizado en Francia e Inglaterra, pero al no existir control en la dosis administrada hubo varios casos con palpitaciones, tembor y pérdida de peso. El uso terapéutico de yodo fue gradualmente abandonado y recién en 1923 fue reintroducido en gran escala, cuando D. Marine realizó estudios sobre profilaxis y terapia del bocio en Estados Unidos.

Como resultado del éxito terapéutico de Coindet, su compañero Prévost postuló que la causa del bocio y cretismo era la deficiencia de yodo. Entre 1850 y 1860 Chatin publicó doce trabajos, en los cuales realizó una gran cantidad de análisis del contenido de yodo en aire, agua, soja y diversos lugares de Francia, Suiza, Inglaterra y el norte de Italia pudiendo observar un paralelismo entre zonas donde había incidencias de bocio y bajo ingesta de yodo.

#### Descubrimiento del yodo en la tiroides:

En 1799, A. Cooper realiza la primera descripción del coloides tiroideo.

"La glándula tiroides se encuentra cerca del cartilago tiroideo. Si bien está clasificada como glándula, no se lo ha comprobado... Cuando se lo corta, se observa que se libera una sustancia parecida a la linfa coagulable, pero más pegajosa..."

El primer estudio sobre la naturaleza química del coloides, fue el de Bubnow (1884). Hizo sucesivas extracciones

con agua, cloruro de sodio 10% e hidróxido de potasio 1%, seguida de acidificación con ácido acético y observó tres fracciones que él creyó que eran diferentes.

Jourlay, en 1894, realizó extracciones con sulfato de magnesio 5%, obteniendo un producto que creyó era una nucleoproteína. Hutchinson, en 1896, fue el primero en reconocer a esa proteína como una globulina y postuló que el coloides era la única sustancia activa de la glándula.

E. Baumann (1896), a partir de un extracto tiroideo, logró aislar un compuesto al cual denominó "yodotirina". El mismo Baumann demostró que la "yodotirina" tenía una acción similar al extracto total cuando era administrado a pacientes hipotiroideos y sugirió que la yodotirina era el principio activo de la glándula. También demostró que las glándulas de los habitantes en zonas bociosas de Alemania, contenían menos yodo que las de los habitantes en áreas no bociosas. Finalmente Baumann y Roos demostraron que la fracción libre de yodo de la tiroides no tenía actividad biológica.

Si bien se fue aceptando que el yodo en la glándula era responsable de su acción fisiológica, hubo algunos que dudaron de ello. A veces no era posible la detección del yodo como resultado del uso de técnicas inadecuadas, de ahí que por ejemplo Mirva y Stolzner (1897) hayan preguntado:

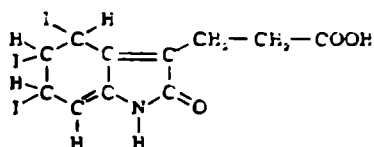
"¿ Es el yodo un constituyente necesario de la tiroides?"

Aún catorce años después, S. Vincent escribía:

"La existencia del yodo en la tiroides es todavía problemática. Está claro que no siempre el yodo está presente en la glándula y que los animales cuya tiroides no contienen yodo, no muestran problemas de salud alguno".

Oswald, un médico Suizo (1899), también encontró que la proteína del coloides era una globulina y la denominó "tireoglobulina".

Nurnberg (1908) encontró que el yodo estaba unido a la tirosina o al triptofano, y fue Kendall en 1917 quien aisló un compuesto al cual denominó "tiroxin" y postuló que tenía la siguiente fórmula:



Para obtener treinta y tres gramos de "tiroxin" empleó tres toneladas de tiroides frescas.

Harrington, en 1926, fue quien estableció finalmente la estructura de la tiroxina.

#### Regulación de la glándula tiroides:

B. Niepce, en su libro "Traité du goitre et du cretinisme" (1851), fue quien estableció la primera asociación entre bocio y agrandamiento de la hipófisis. Más tarde, Boyce y Beadles (1892) describieron hiperplasia de la glándula tiroides y formación de coloides en la hipófisis anterior de sujetos mixedamatosos.

La primera evidencia experimental de hipertrofia del lóbulo anterior de la hipófisis, luego de tiroidectomía en conejos y perros, fue realizada por Rogowitsch. Adler (1914), Smith (1916) y Allen (1916) realizaron experimentos en los cuales la hipofisectomía impedía la metamorfosis en el renacuajo, efectos que podían revertirse administrando extractos hipofisarios.

Smith y colaboradores, en 1922, encontraron que extractos frescos de hipófisis bovina podían reactivar tiroides atrofiadas de ratones hipofisectomizados.

Uhlenhuth y Schwartzbach (1927) demostraron que no había conexión nerviosa entre la tiroides y la hipófisis, pero que el control de la función tiroidea y la hipófisis estaba afectado por sustancias del lóbulo anterior hipofisario.

Dott en 1923, luego de experimentar con perros, sugirió que la tiroides y la hipófisis existían en una relación complementaria y vicariante. Ocho años después, Arón postuló que ambas glándulas se encontraban mutuamente balanceadas.

Los primeros intentos de aislar TSH fueron realizadas por Jansen y Loeser en 1931. De ahí en más se sucedieron los trabajos en los que se obtenían preparaciones con mayor actividad biológica.

Respecto a una regulación por parte del sistema nervioso, Reith en 1865 sugirió que la enfermedad de Graves y Basedow podría estar causada por una hiperactividad del sistema simpático cervical. También fue Reith quien observó cambios patológicos en la estructura simpática cervical de pacientes hipertiroideos y de ahí que se haya tratado de remover los nervios simpáticos cervicales para el tratamiento de la enfermedad.

Pocos años después del descubrimiento de la epinefrina, Kraus y Friedenthal en 1908 encontraron que ésta podía reproducir varios de los fenómenos característicos del hipertiroidismo.



Posteriormente, en épocas más recientes, continuaron los estudios tanto experimentales como clínicos que nos han llevado a la concepción actual de la función tiroidea y de su regulación. (Ver revisiones de Incolla, 1955; Pitt-Rivers, 1978).

## 2. SÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

La glándula tiroides, a diferencia de otras glándulas endocrinas, necesita el aporte de un elemento exógeno para la síntesis de sus hormonas. Tal elemento es el "yodo", y de un aporte más o menos constante del mismo depende un correcto funcionamiento de la glándula.

La importancia de las hormonas tiroideas está dada por las diversas funciones que regulan, tales como: desarrollo neuromuscular, crecimiento, diferenciación, oxidaciones celulares, etc. y por la cantidad de tejidos u órganos en las cuales tienen acción: cerebro, hígado, pulmón, corazón, sangre, músculo, hipófisis, etc.

Las hormonas tiroideas son aminoácidos yodados (figura 2 ) y su síntesis y secreción la podríamos esquematizar en cinco etapas: a). Captación del yoduro; b). Síntesis de una proteína: tiroglobulina; c). Yodinación de los restos tirosilos de la tiroglobulina; d). Acoplamiento de las yodotirosinas y e). Endocitosis y proteólisis de la tiroglobulina con liberación de las hormonas tiroideas y de yodotirosinas.

### a). CAPTACION:

La absorción de yodo se produce en el intestino en su forma inorgánica o formando parte de compuestos orgánicos. Ya en el torrente sanguíneo, el 66% del yoduro es filtrado por el riñón y el resto es captado por la tiroides.

La captación de yodo se realiza mediante un transporte activo (ver revisiones de Wolff F., 1972 y Bastomsky C., 1974)

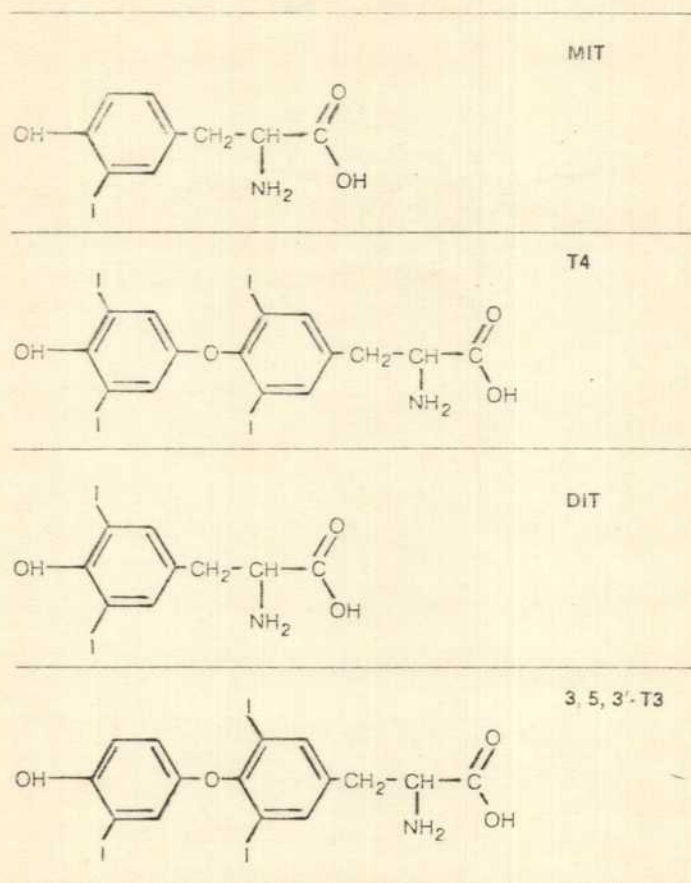


FIGURA 2

HORMONAS TIROIDEAS Y SUS PRECURSORES

Para ello, la tiroides posee una bomba de yodo que requiere energía para su funcionamiento, en la que estaría involucrada una enzima: la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  dependiente, de acuerdo a los trabajos de Wolff y Halmi (1963) en cobayos, aunque estos resultados no pudieron ser reproducidos por Brunberg y Halmi (1966) en tiroides de rata. Se postula también a las lecitinas de la membrana como el transportador de yodo (Schneider y Wolff, 1965).

Este transporte es inhibido por aniones competitivos tales como:  $\text{At}^-$ ,  $\text{TcO}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ , etc. siendo empleados estos dos últimos en la clínica por su capacidad de descargar el yodo no organificado y así entonces poder diagnosticar defectos en la síntesis de hormonas tiroideas.

#### b). SINTESIS DE LA TIROGLOBULINA:

La tiroglobulina es una proteína globular, cuyo peso molecular es de 660.000 y su coeficiente de sedimentación es 19 S. Consta de una parte proteica y otra de carbohidratos que representan el 10% de la molécula. (Spiro, R. y Spiro, H; 1965).

La síntesis de la estructura proteica de la tiroglobulina se realiza en los ribosomas ligados a membrana. (Vassart, 1972)

Una vez sintetizada durante el trayecto hacia el aparato de Golgi, la tiroglobulina es glicosidada. Estudios cinéticos han demostrado que la incorporación de manosa, azúcar proximal de la unidad glucídica, ocurre en el retículo endoplasmático, mientras que la incorporación de ácido siálico, el azúcar más distal en el aparato de Golgi. (Whur y col. 1969 y Mónico y col. 1973).

Estudios con autoradiografía (Bjorkman y col., 1974) y con técnicas de fraccionamiento celular (Bjorkman y Ekholm, 1975) evidenciarían que la transferencia de tiroglobulina al lumen folicular, se produciría englobada en vesículas antes de la yodinación, aunque es un tema que está en discusión, (ver revisión de Ericson, 1981).

c). MECANISMO DE YODINACION:

El yoduro debe activarse a un estado de oxidación superior para poder reaccionar con los grupos tirosilo de la tiroglobulina. En este proceso están involucrados agua oxigenada y una peroxidasa que poseería sitios activos independientes para el yodo y la tirosina (Yamamoto y De Groot, 1982). La peroxidasa no sólo cataliza la iodinación sino también el acoplamiento de las yodotirosinas. (Taurog, 1978).

La yodinación de la tiroglobulina se lleva a cabo en la membrana apical (Nadler y Leblond, 1955; Ekholm, 1981), aunque estudios llevados a cabo con células aisladas por tripsinización mostraron que éstas conservan su capacidad de sintetizar hormonas a pesar de no conservar su estructura folicular (Tong y col., 1962). Matsukawa y col., en 1979 demostraron también que la tiroglobulina puede ser yodinada justo antes de su secreción a el lumen, probablemente en las vesículas apicales.

La peroxidasa tiroidea ha sido parcialmente purificada, su peso molecular está en el rango de 60000-100000, y al igual que otras peroxidases es una hemoproteína. (De Groot y Niemniszcze, 1977).

La biosíntesis de hormonas tiroideas depende de la can tidad de yodo disponible por la glándula. A medida que se administran cantidades crecientes de yodo, aumenta la organificación del mismo, llegando a una concentración dada, donde por encima de ella se produce un descenso progresivo en la proporción de yodo organificado, efecto conocido como Wolff y Chaickof (1948). Más adelante nos referiremos en detalle sobre este punto.

d). FORMACION DE LAS YODOTIRONINAS:

Existen dos teorías sobre el posible mecanismo de formación de las yodotironinas. El acoplamiento de las yodotironinas podría ser intramolecular o intermolecular, siendo esta reacción catalizada también por una peroxidasa (Lamas y col., 1972), aunque ambas reacciones pueden ser disociadas (Virion y col., 1979).

Tanto la reacción de yodinación como la de acoplamiento, son inhibidas por ciertas drogas como por ejemplo: tiourea, metiltiouracilo, tiouracilo, propiltiouracilo, metilmercaptimidazol, etc., siendo varios los mecanismos que se han postula do para dicha inhibición. (Taurog, 1976; Green, 1978). Se ha encontrado cierta selectividad en la acción de las drogas antitiroideas, así por ejemplo, las dosis requeridas para la inhibición de la reacción de acoplamiento serían menores que las requeridas para la yodinación tanto "in vivo" (Ilno y col., 1961) como "in vitro" (Engler y col., 1982).

e). ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS:

Una vez sintetizadas las hormonas tiroideas, la tiroglobulina que las contiene es almacenada en el coloides. Puesto que las hormonas tiroideas son liberadas al torrente circulatorio como aminoácidos libres, debe producirse primero la proteólisis de la tiroglobulina.

Este proceso de secreción ocurre en varias etapas: primero la endocitosis de la tiroglobulina involucrando dos mecanismos: macropinocitosis y micropinocitosis (ver revisión Ericson, 1981).

Una vez que es incluida la gota de coloides, hay migración de los lisosomas para luego fusionarse con la gota de coloides dando lugar a la formación del fagolisosoma o lisosoma secundario. Allí es donde ocurre la digestión enzimática de la tiroglobulina, con liberación de las hormonas tiroideas; éstas son liberadas al torrente circulatorio, mientras que las tirosinas son dehalogenadas (ver revisión de Van Herle y col., 1979). En la figura 3, tenemos esquematizadas las etapas de la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas.

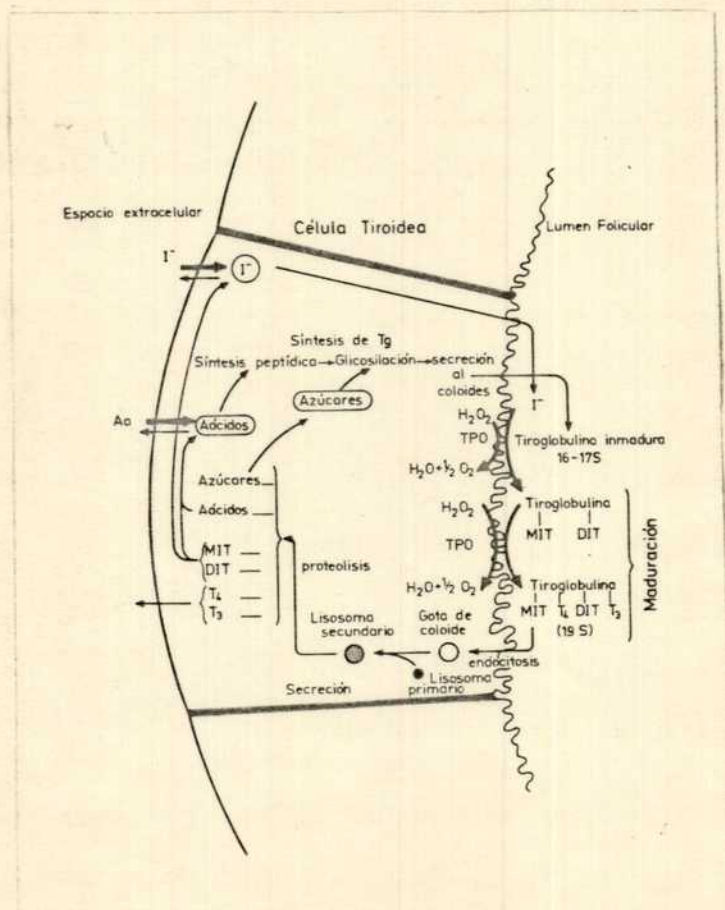


FIGURA 3

ESQUEMA DE LA BIOSÍNTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS



### 3. REGULACION

La glándula tiroides (\*) está regulada por una serie de factores. Hasta hace pocos años se aceptaba que la tirotrofina era el único regulador. Hoy sabemos que existen varios moduladores de la función tiroidea: catecolaminas, agentes colinérgicos, prostaglandinas, inmunoglobulinas estimulantes, yoduro, etc.

#### 3.1. Tirotrofina:

El lóbulo anterior hipofisario controla la función tiroidea mediante la síntesis y secreción de la tirotrofina. Dicho control se traduce en un estímulo de los diferentes parámetros tiroideos, que tienen como fin aumentar la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (Ahn C. y Rosenberg, 1970; Tonoue y col., 1970) así como el mantenimiento del crecimiento celular.

La tirotrofina (TSH) es una glicoproteína con un peso molecular estimado en 28000. Se sintetiza en los tirotrofos, células basófilas de la adenohipófisis y su síntesis y secreción se encuentran bajo control de diversas áreas del sistema nervioso central (Morley, 1981), siendo la más importante la zona hipotálamica a través de la hormona liberadora de TSH (TRH).

---

(\*) La glándula tiroides está constituida por células foliculares cuya función es la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas y por las células C, en menor proporción, que se encargan de la síntesis y secreción de calcitonina. Esta tesis se referirá exclusivamente a las células foliculares.

Las hormonas tiroideas disminuyen la TSH plasmática; este proceso de regulación se ejerce a tres niveles:

- a). inhibición en la síntesis de la TSH (Spira y col, 1979);
- b). inhibición de la secreción de TSH (Vale y col, 1968) y
- c). disminución del número de receptores para TRH (Perrone y col, 1978; De Lean y col, 1977).

Es decir, que la hipófisis y la tiroides se encuentran en un estado de control mutuo (Fig.4 ). Ante una disminución de las hormonas tiroideas en sangre, se produce un aumento de la TSH que lleva a la tiroides a aumentar las yodotironinas circulantes con lo que se restablece el equilibrio.

En cuanto a su mecanismo de acción, en su fase inicial la tirotrofina se comporta como las demás hormonas proteicas, uniéndose a un receptor específico ubicado en la membrana celular (Amir y col., 1973; Lissitzky y col., 1973; Manley y col., 1972). Existen discrepancias respecto al peso molecular del receptor y a la existencia de uno o dos tipos de sitios de unión. Para los sitios de alta afinidad y baja capacidad, la  $K_a$  sería del orden de  $5 \times 10^{10}$  a  $10^8 \text{ M}^{-1}$  y para los sitios de baja afinidad y alta capacidad, del orden de  $10^7$  a  $10^6 \text{ M}^{-1}$  (Kotani y col., 1975; Moore y Wolff, 1974).

Se ha sugerido que "compuestos" del tipo de los gangliosidos formarían parte del receptor para TSH. Mullin y col., (1976) demostraron que el agregado de gangliosidos inhibía la unión de TSH a membrana de tiroides bovina. Czarnocka y col., (1981) aislaron dos fracciones glicopro-

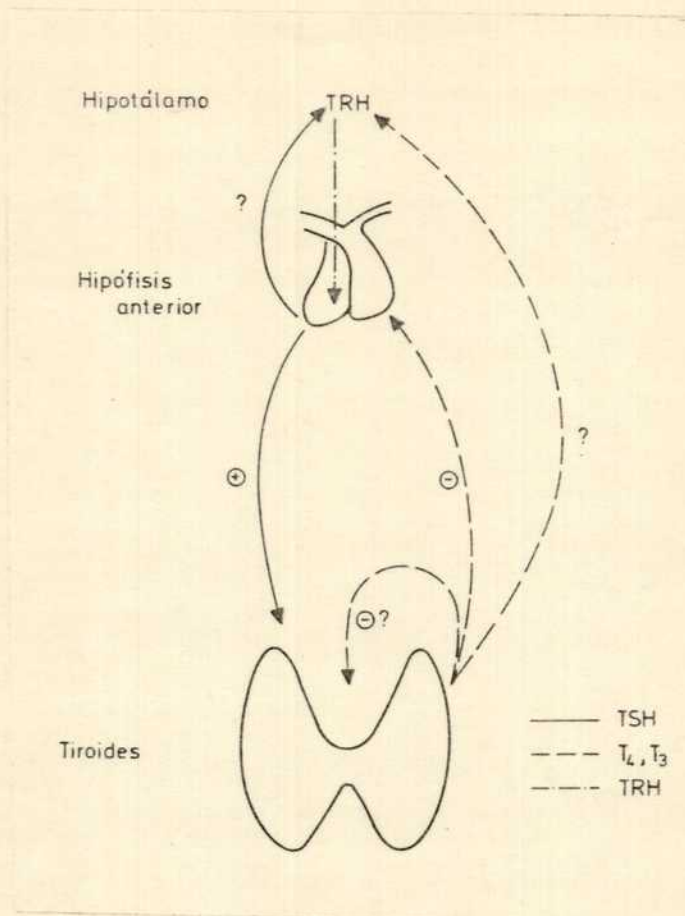


FIGURA 4

EJE HIPOTALAMO - HIPOFISO - TIROIDEO

teicas de membranas de tiroides bovinas que también inhibieron la unión de TSH. Meldolesi y col., (1976) encontraron en una línea tumoral de tiroides de rata que no tenía respuesta a la TSH y sí al db AMPc, que no había unión de la hormona y que el contenido de ciertos gangliosidos estaban disminuídos en las membranas tumorales.

Trabajos de De Robertis (1961) demostraron por primera vez que la tirotrofina puede entrar a la célula tiroidea aunque su significado biológico no está aún esclarecido.

Como consecuencia de la interacción con su receptor, la tirotrofina estimula la adenilato ciclasa que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP (Pochet y col.,1974). El AMPc formado sería el mediador de prácticamente todas las acciones de la TSH, aunque sólo en algunos sistemas (estudios in vitro en tiroides de perro) y para algunos de los efectos de la hormona, han sido demostrados los criterios de Sutherland para convalidar la hipótesis que el AMPc es el mediador de la tirotrofina (Dumont y Vassart,1980; Dumont y col.,1978). Existen también efectos "rápidos" de la TSH que no son mediados por AMPc, como por ejemplo el aumento del turnover del fosfatidilinositol (Jacquemin y Haye, 1970).

Codaccioni y col. (1980) trabajando con una glándula de un paciente hipotiroideo encontraron que, a pesar de no existir anormalidad en la unión de la TSH a su receptor, no existía respuesta de la glándula a la TSH, sí en cambio al

NaF, llegando a la conclusión que la falla se debía a una anomalía en el sistema TSH-receptor-adenilatociclasa.

La adenilatociclasa se comportaría de igual forma que en otros tejidos (Abramowitz y col.,1979), existiendo una unidad regulatoria a la cual se uniría el GTP (Verrier y col.,1980).

Los efectos del AMPc serían a través de la activación de proteíncinasas (Spaulding y Burrow,1972,1974; Field y col.,1975). (Fig. 5 )

- Acciones de la TSH:

Las acciones de la TSH se podrían clasificar en efectos rápidos que requieren pocos minutos para su manifestación: estimulación de la secreción, organificación del yodo, acoplamiento de yodotirosinas, respiración mitocondrial, etc. y efectos lentos que se evidencian a las horas o incluso días, relacionados principalmente con el crecimiento celular y diferenciación celular.

La TSH regula prácticamente todos los metabolismos tiroideos (Field,1978; Dumont,1971).

a). Metabolismo del yodo:

Uno de los efectos agudos de la TSH sobre el metabolismo del yodo es la disminución de la relación I tiroides/I suero, debido a un aumento del flujo del yodo desde la célula tiroidea, como consecuencia de un aumento en la permeabilidad de la membrana (Halmi y col.,1960; Knopp y col.,1970). Luego de algunas horas, el efecto se revierte observándose una estimulación sobre el transporte de yodo (Halmi y col.,1960; Williams y Maloyan,1975).



Durante este lapso, el aumento en la bomba de yodo puede ser bloqueado por el agregado de actinomicina D o cicloheximida, lo que estaría indicando que el efecto de la TSH se ejerce a través de la síntesis de una proteína involucrada en la captación ya que la hormona aumenta la  $V_{max}$  sin afectar el  $K_m$  del sistema de transporte del yodo.

La TSH también aumenta la organificación del yodo, siendo dicho efecto independiente de su acción sobre el transporte del yodo y de la síntesis de tiroglobulina. El efecto se ejerce tanto a nivel de la formación de yodotirosinas (MIT, DIT) como del acoplamiento de las mismas para dar  $T_3$  y  $T_4$ , y no es bloqueado por el agregado de inhibidores de la síntesis proteica (Tong, 1965). Una de las causas del aumento de la organificación producido por TSH es su efecto sobre el metabolismo de los carbohidratos, como se verá luego aumentando los piridín nucleótidos responsables, quizás en la generación de  $H_2O_2$ , sustrato de la peroxidasa, enzima involucrada en la organificación (De Groot y Nieppomnische, 1977).

Uno de los parámetros más tempranamente afectados por la TSH es la secreción de hormonas tiroideas. En trabajos in vitro, la formación de pseudopodos se puede observar a los dos minutos de haber agregado la TSH al medio de incubación, seguida de la ingestión y proteólisis de las gotas de coloide (Williems y col., 1970).

Estos efectos se pueden observar a los pocos minutos de agregar la TSH, y no estarían mediados por AMPc. El agregado de bloqueantes adrenérgicos que inhiben la estimulación de la adenilato ciclasa por parte de la TSH, no abuelen los efectos de la hormona sobre la síntesis de fosfolípidos; más aún estos efectos no son reproducidos por la  $PGE_1$  y la teofilina que aumentan los niveles de AMPc. Gerard y col., (1982) trabajando con células de tiroides porcinas en cultivo, encontraron que el AMPc podría ser el mediador de los efectos crónicos de la TSH.

La síntesis de prostaglandinas también está aumentado por el agregado de TSH (Burke y col., 1973; Igaraski y Kono, 1981) acción que estaría dada por un aumento de los niveles del ácido araquidónico proveniente del fosfatidilinositol, por un mecanismo independiente de AMPc o proveniente de triglicéridos, efecto éste mediado por AMPc (Haye y col., 1974).

Trabajos recientes cuestionan la participación de la TSH en la síntesis de prostaglandinas (Boeynaems, 1983).

d). Metabolismo de las proteínas:

Si bien existe una síntesis de aminoácidos, a partir de intermediarios del metabolismo de la glucosa y del ciclo de Krebs, el mayor aporte es a través del pool exógeno de aminoácidos, siendo estimulada esta entrada por la TSH. (Raghupathy y col., 1964).



Entre otros parámetros, la TSH estimula la hidrólisis de tiroglobulina y la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -leucina y  $^{14}\text{C}$ -tirosina a tiroglobulina y proteínas no yodadas. (Tong, 1967; Lecocq y Dumont, 1973)

La TSH aumenta también la agregación de polisomas durante la traducción. Algunos de estos efectos son independientes de una acción de la TSH sobre la síntesis de ARN (Tong, 1967).

El AMPc sería el mediador de estas acciones. Este nucleótido reproduce los efectos de la TSH en la estimulación de la síntesis proteica in vitro (Lecocq y Dumont, 1972; Pisarev y col., 1977; Wilson y col., 1968) como in vivo (Pisarev y col., 1970).

e). Metabolismo de ácidos nucleicos:

La TSH estimula la incorporación de precursores a ARN, aunque esto sería como consecuencia de un aumento en el pool de ribonucleótidos (Lindsay y col., 1969). Sin embargo existen evidencias de un efecto directo de la TSH sobre la transcripción. En núcleos de tejidos pretratados con TSH, se encontró un aumento en la actividad de la ARN polimerasa (Adiga y col., 1971) así como la incorporación de UTP a ARN (Begg y Munro, 1965; Kleiman de Pisarev y col., 1979; Pisarev y Spaulding, 1980).

Chebath y col., (1979), en cultivo de células tiroideas porcinas y Waddeleux y Winand (1981) en cultivos de células tiroideas humanas encontraron un aumento del ARN mensajero de la tiroglobulina cuando se cultivaban en presencia de TSH.

La administración crónica de TSH causa hiperplasia e hipertrofia tiroidea no estando aumentado el contenido de ADN por núcleo, sí en cambio el contenido de ARN por célula (Matovinovic y Vickery, 1959).

El AMPc reproduce los efectos de la TSH sobre la incorporación de precursores a ARN (Lamy y col., 1971; Pisarev y col., 1977) y sobre la ARN polimerasa (Adiga y col., 1971).

Si bien se está de acuerdo que el AMPc sería el mediador de la TSH en la inducción de fenómenos de diferenciación, no está claro aún su posible rol en los diferentes procesos de crecimiento celular. El db AMPc no reproduce los efectos mitogénicos de la TSH, ni aumenta la síntesis de ADN en cultivos celulares. (Pawlikowsky y col., 1979; Winand y col., 1976).

La célula tiroidea posee un mecanismo de tipo "autorregulatorio" para modular la respuesta a la tirotrofina.

Se ha demostrado que la exposición a la TSH hace a la glándula refractaria a una segunda estimulación por parte de TSH (Shuman y col., 1976; Rapoport y Adams, 1976). Se han encontrado dos tipos de mecanismos de desensibilización.

# EFFECTOS DE LA TSH

(Tomado de: Dumont y Vassart, 1978)

	Tiempo de acción	Inhibido por		Lugar de acción Estructura	Función	Efectos Dependientes
		Actino	Puro Micina			
A	+ seg.	o	o	Membranas	Transporte Permeabilidad	↑ Captación (Glucosa, AA) ↑ PBI
B	++ Min.	o	o	Membrana Citoplasma	Formación de efectores alostéricos (AMPC)	↑ Fagocitosis ↑ Metabolismo Energético
C	+++ Min.	o	+	Citoplasma	Traducción (Sint-proteica)	?
D	+++++ Horas	+	+	Núcleo	Transcripción (Sint-ARN)	↑ Captación I <sup>-</sup> ↑ peso ↑ Ribosomas ↑ Mitosis
E	+++++ Días	+	+	Núcleo	Transcripción (Sint-ARN)	Aparición de: síntesis Tg <sub>2</sub> oxidación I <sub>2</sub> Estructura folicular

Uno involucra el sistema AC-AMPC y es específico por cuanto la preincubación con TSH no modifica la estimulación en la formación del AMPc producido por prostaglandinas  $E_1$ , ni por la toxina del cólera (Holmes y col., 1980; Shuman y col., 1976). El otro sistema sería distal a la formación de AMPc y es no específico, pues durante el período de refractoriedad inducido por la TSH disminuyen los efectos estimulatorios del AMPc,  $PGE_1$  y acetilcolina sobre diferentes parámetros, como por ejemplo: oxidación de glucosa, organificación del yoduro, incorporación de  $^{32}P$  a fosfolípidos (Field y col., 1977, 1979).

El fenómeno de desensibilización ha sido vinculado a un aumento en la ADP ribosilación de la subunidad G de la adenilato ciclasa. (Vitti y col., 1982)

### 3.2. Prostaglandinas:

La tiroides sintetiza varias clases de prostaglandinas:  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ , 6-ceto  $PGF_{1\alpha}$  y tromboxano  $B_2$  (Haye y Jacquemin, 1977; Boeynaems y col., 1979). Friedman y col. (1975) demostraron la presencia de la prostaglandina sintetasa en fracciones microsomales de tiroides bovinas. Estos mismos autores (1976) encontraron en homogenatos de tiroides bovinas, la presencia de la prostaglandin  $E_2$ -9-cetorreductasa, enzima responsable de la interconversión de  $PGE_2$  en  $PGF_{2\alpha}$ .

Como se mencionó anteriormente, el precursor en la síntesis de prostaglandinas es el ácido araquidónico, que puede originarse por dos mecanismos diferentes, uno por la liberación del ácido araquidónico de triglicéridos por acción de una

activación de la proteínkinasa (Spaulding y Burrow, 1975).

Las prostaglandinas  $E_1$ ,  $A_1$ ,  $F_{1\alpha}$  y  $F_{2\alpha}$  no producen aumento en la incorporación de  $^3H$ -uridina a ARN en las mismas condiciones en que se observa estímulo por parte de la TSH (Juvenal y col., 1978).

Estos datos llevan a la conclusión que las prostaglandinas no son intermediarias en la acción de la TSH.

Los efectos de las prostaglandinas de la serie F son más difíciles de evaluar, por cuanto no hay una uniformidad de criterios en cuanto a su acción. Yamamoto y col., (1979) no encontraron estimulación de la adenilato ciclasa. En cambio Van Sande y col., (1982) trabajando con dosis altas de prostaglandinas  $F_{1\alpha}$  y  $F_{2\alpha}$ , encontraron aumento en la acumulación de AMPc; por el contrario, dosis bajas inhibieron la acumulación de AMPc inducido por TSH,  $PGE_1$  y toxina del cólera.

La administración de  $PGF_{2\alpha}$  a una mujer embarazada, para inducir el aborto, produjo un aumento en los niveles circulantes de  $T_3$  y  $T_4$ , no así los de TSH (Shenkman y col., 1974).

La indometacina no disminuye la organificación del yodo, sí lo hace la aspirina, siendo esta acción inhibitoria independiente de su efecto sobre la síntesis de prostaglandinas (Boeynaems, 1975 y Madaovi, 1974).

Wolff y Moore (1973), no encontraron efecto alguno de la indometacina sobre la secreción "in vitro" de hormonas tiroideas. Boeynaems y col., (1975) encontraron que la indometacina inhibe los efectos del AMPc y de la TSH sobre la secreción de hormonas tiroideas. Sin embargo, las concentraciones necesarias para obtener esta inhibición eran 1000 veces mayores que las que se requerían para inhibir la síntesis de prostaglandinas. (Boeynaems, 1979).

En trabajos realizados en ratas "in vivo" la indometacina, la aspirina y la hidrocortisona inhibieron el efecto mitogénico de la TSH (Sluszkiewicz y Pawlikowski, 1980). En el ser humano, la administración de indometacina no altera los niveles circulantes de  $T_4$ ,  $T_3$ , ni la concentración sérica de TSH (Ramey y col., 1976; Croxson, 1977).

Los glucocorticoides, inhibidores de la fosfolipasa, (Hong y Levine, 1976) disminuyen los niveles plasmáticos de  $T_3$  (Chopra y col., 1975; Düick y col., 1974) aunque estos efectos se deban probablemente a una alteración en el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas.

Por lo expuesto anteriormente, no está claro aún el posible rol de las prostaglandinas en la regulación de la función tiroidea.

### 3.3. Sistema $\text{Ca}^{2+}$ -GMPc:

La posible participación del GMPc en la regulación de la función tiroidea, fue sugerida por Pisarev y col., (1971) al observar un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -leucina a proteínas tiroideas en ratones pretratados con GMPc, y por Macchia y Varrone (1971) midiendo el mismo parámetro en cortes de tiroides porcina. El GMPc aumenta también la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a RNA tiroideo (Pisarev y Kleiman de Pisarev, 1977).

Yamashita y Field (1972) demostraron la presencia de GMPc en tiroides, y que éste no es regulado por la TSH.

Barmasch y col., (1973) identificaron a la guanilato ciclasa, enzima que cataliza la conversión de GTP en GMPc, en tiroides de rata.

La carbamilcolina, la serotonina, el ClK y el FNa aumentan los niveles de GMPc, (Yamashita y Field, 1972; Van Sande y col., 1975a), no observándose efecto alguno en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El aumento en los niveles de GMPc se observa por el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  en concentraciones del orden 10mM o de 1mM, en presencia del ionofero A23187, indicando que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular regularía los niveles del GMPc, como sucede con otros tejidos (Schultz y col. 1973).

De acuerdo a la hipótesis de Goldberg, la tiroi-  
des no respondería a los esquemas clásicos de sistemas  
unidireccionales o bidireccionales. En el sistema uni-  
direccional el GMPc y el AMPc actúan en paralelo; por  
el contrario en los sistemas bidireccionales, ambos nu-  
cleótidos tienen efectos opuestos.

Los compuestos que aumentan los niveles de GMPc,  
al igual que la TSH, estimulan la organificación del  
yodo, pero disminuyen el efecto de la TSH sobre los  
niveles de AMPc y sobre la secreción (Van Sande y col.,  
1975a; Champion y col., 1974), no estando claro si di-  
chos efectos son producidos por el  $\text{Ca}^{2+}$  "per se" o por  
un aumento en los niveles de GMPc como consecuencia  
de un aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dumont  
y Vassart, 1978).

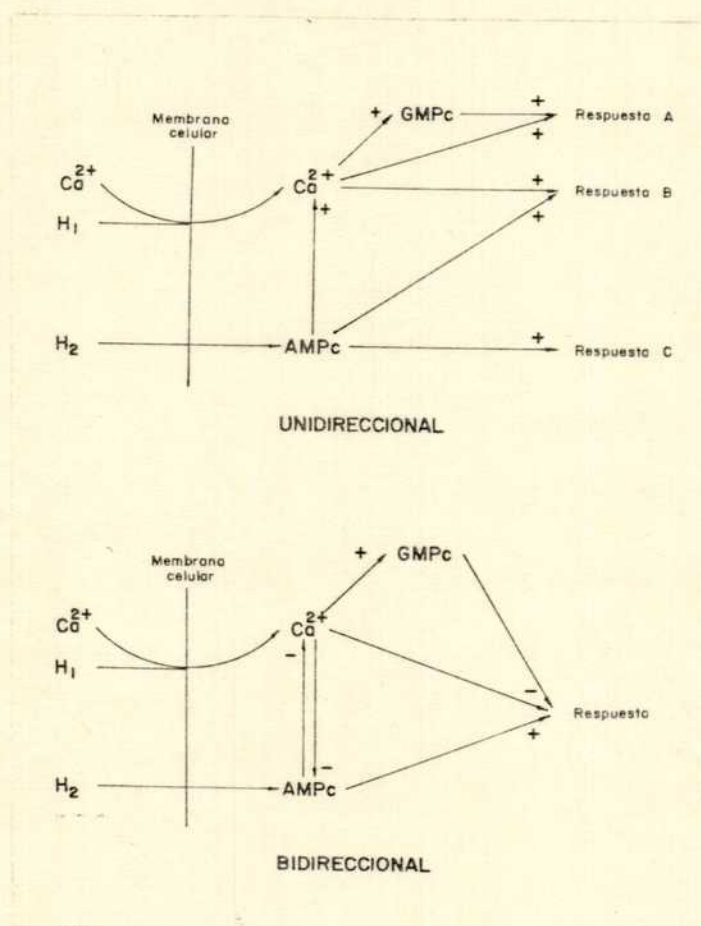
Spaulding (1979), trabajando con compuestos nitro-  
genados, observó que éstos, en bajas concentraciones,  
aumentaban los niveles de GMPc pero no tenían efecto al-  
guno sobre los niveles de AMPc. Estos efectos se obser-  
vaban aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriéndose que los  
neurotransmisores podrían actuar sobre un pool diferente.

Erneux y col., (1977) postularon que el GMPc aumen-  
ta la hidrólisis del AMPc, activando fosfodiesterasas,  
siendo este efecto bloqueado por la adición de metilxan-  
tinas.



FIGURA 6

ESQUEMAS PROPUESTOS PARA EL MECANISMO DE ACCION DEL GMPc,  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc. MODIFICADO DE TORRES, 1980.



Champion y Jacquemin (1978), observaron que la  $\text{PGF}_2$  aumentaba los niveles de  $\text{GMPc}$  sin afectar los de  $\text{AMPc}$ . Por el contrario, Van Sande y col., (1982) encontraron que, sin alterar los niveles de  $\text{GMPc}$ , la  $\text{PGF}_2$  en altas concentraciones aumentaba los niveles de  $\text{AMPc}$  y a bajas concentraciones inhibía la acumulación de  $\text{AMPc}$  inducida por TSH,  $\text{PGE}$  y toxina del cólera, dependiendo estos efectos de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y bloqueados por metilxantinas.

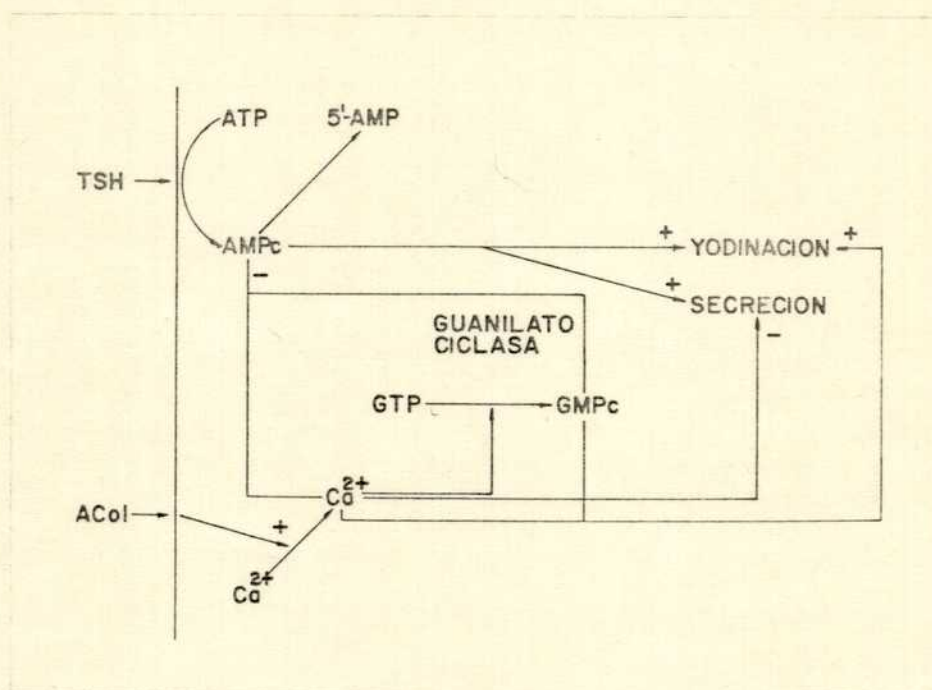
El ácido araquidónico, que es en parte convertido a  $\text{PGF}_2$  en la tiroides, inhibe la acumulación de los niveles de  $\text{AMPc}$  por parte de la TSH, aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este efecto no sería mediado por la  $\text{PGF}_2$ , por cuanto es específico para TSH, no observándose bloqueo de los efectos de la toxina del cólera y  $\text{PGE}_2$  (Van Sande y col., 1982).

Por otra parte, el efecto del  $\text{ClK}$  y del  $\text{FNa}$ , sobre la acumulación de  $\text{AMPc}$ , no es bloqueado por la atropina, lo que indicaría que no es mediado a través de la liberación de acetilcolina y es observado aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriéndose un mecanismo del  $\text{GMPc}$  independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . (Van Sande y col., 1979)

Por lo mencionado anteriormente, el papel del  $\text{GMPc}$  en la regulación tiroidea no es claro aún, requiriéndose más estudios para dilucidar este aspecto de la regulación tiroidea. (Ver Rev. Dumont y col., 1977).

FIGURA 7

INTERRELACION DEL AMPc Y DEL GMPc EN LA REGULACION DE  
ALGUNOS PARAMETROS DE LA FUNCION TIROIDEA. TOMADO DE  
DUMONT y VASSART, 1980.



#### 3.4. Sistema Nervioso Parasimpático:

Son pocas las evidencias de una posible participación del sistema nervioso parasimpático en la regulación de la función tiroidea.

Pastan y col., (1961) demostraron que la acetilcolina estimula la oxidación de glucosa 1-<sup>14</sup>C y glucosa 6-<sup>14</sup>C en cortes de tiroides canina. La carbamilcolina también aumenta la oxidación de glucosa 1-<sup>14</sup>C y la organificación del yodo, bloqueando el efecto estimulatorio de la TSH sobre la acumulación de AMPc y secreción de hormonas tiroideas (Van Sande y col., 1975). Estos mismos autores, junto con Yamashita y Field (1972), postularon que el mediador de la regulación colinérgica es el GMPc, como se comentara anteriormente; aunque trabajos de Decoster y col., (1976) demostraron una disociación entre la acumulación del GMPc y la acción inhibitoria de la acetilcolina sobre la secreción, sugiriendo que este nucleótido no es el mediador de dicho efecto.

Resultados similares fueron obtenidos por Champion y Mauchamp (1982a), al no observar modulación de los niveles de GMPc por parte del carbacol.

La carbamilcolina estimula la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a RNA, en cortes de tiroides bovina (Juvenal y col., 1978), estando bloqueado este efecto por la atropina, indicando que un receptor muscarínico estaría

involucrado en la acción de la carbamilcolina.

La carbamilcolina estimula también la liberación de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{TxB}_2$  en cortes de tiroides canina, requiriendo  $\text{Ca}^{2+}$  para la manifestación de dicho efecto. (Boeynaems y col., 1979).

La presencia de fibras colinérgicas interfoliculares, ha sido demostrada en el buey (Melander, 1973), en el ratón (Melander, 1979) y en el hombre (Van Sande y col., 1980)

Champion y Mauchamp (1982a) demostraron la existencia de receptores muscarínicos colinérgicos, en cultivos de células de tiroides porcina con una  $K_a$  de  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y una capacidad de 880 sitios por célula.

La adición de carbamilcolina al cultivo produce una desensibilización de las células a una posterior acción del carbacol, así como una disminución en el número de receptores muscarínicos. (Champion y Mauchamp, 1982b).

### 3.5. Sistema Simpático:

Melander y col., (1974a) demostraron en el hombre la presencia de numerosos terminales nerviosos adrenérgicos que inervan no sólo los vasos sanguíneos tiroideos, sino que llegan a las células foliculares. Existen marcadas diferencias en el grado de inervación tiroidea

entre las diversas especies animales. El hamster, la oveja y el ratón poseen abundantes terminaciones simpáticas en las células tiroideas, en tanto que ellas no son tan numerosas en la rata, el perro y el cerdo (Melander y col., 1975a)

Histológicamente, no sólo se ha demostrado que existen terminales simpáticas en las células tiroideas, sino que ellas desaparecen luego de la simpatectomía cervical superior (Melander y col., 1974b).

#### - EFFECTOS FUNCIONALES:

La participación del sistema simpático en el control de la función tiroidea, ha sido examinada en experimentos, tanto in vivo como in vitro.

Según la especie animal utilizada, así como el diseño experimental de los estudios, se ha observado que las catecolaminas pueden estimular, inhibir o carecer de efecto sobre la función tiroidea. Por otra parte, se ha argumentado que los efectos de las catecolaminas se deberían a meras alteraciones en el flujo sanguíneo tiroideo. (Brown Grant y Gibson, 1956; Falconer, 1967; Mowbray, 1960).

La hipótesis sobre la posible participación del sistema simpático en la regulación de la función tiroidea, data del siglo pasado, cuando se postuló que el bocio difuso tóxico podría resultar de una hiperactividad del sistema simpático. Esta idea se vio reforzada por la demostración que la epinefrina era capaz

de reproducir alguno de los síntomas del hipertiroidismo, y llevó a Keittin (1865) a postular a la simpatectomía cervical como terapéutica. Aunque este método de tratamiento ha sido ya abandonado, en años recientes se ha introducido el uso de drogas bloqueantes adrenérgicos, para aliviar o atenuar los síntomas del hipertiroidismo y de la crisis tirotóxica (Cavalieri, 1981) aunque este uso se basa en el hecho de que dichas drogas bloquean el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas. (Ver Rev. Melander, 1978).

La administración de epinefrina disminuyó la captación de  $^{131}\text{I}$  en ratas, en las cuales la organificación del yodo estaba bloqueada por administración de PTU, al igual que la captación de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  (Joasoo y Murray, 1974a).

Una infusión continua de epinefrina produce vasoconstricción tiroidea en conejos, con la concomitante depresión de la captación de  $^{131}\text{I}$ , (Brown Grant y Gibson, 1956); una disminución semejante se observó en ratas, luego de la administración sistémica de epinefrina (Botkin y Jensen, 1952). En el hombre se han registrado efectos estimulatorios por una inyección aguda de epinefrina, mientras que la infusión de la misma deprime la captación de  $^{131}\text{I}$  (Hays, 1965).

Maayan e Ingbar (1968, 1970a) y Melander y col., (1973), trabajando con células de tiroides aisladas, observaron que la norepinefrina y el isoproterenol

estimulan la acumulación y organificación del yodo, siendo bloqueados los efectos estimulatorios por la adición de fentolamina, pero no por el propranol. Estos resultados indicarían que el efecto estaría mediado por receptores  $\alpha$  adrenérgicos (Maayan, 1977).

Las catecolaminas aumentan la organificación del yodo, aún en presencia de inhibidores del transporte activo del yodo. Masini y Coleoni (1981), postularon que el efecto estimulatorio de la epinefrina y norepinefrina sobre la organificación del yoduro se debería a una generación de  $H_2O_2$ , al ser metabolizadas las catecolaminas por la monoaminoxidasa tiroidea.

La inyección de epinefrina en ratas, aumentó la incorporación de yodo a MIT respecto a DIT y disminuyó su incorporación a yodotironinas (Joasoo, 1974). Este efecto se ejercería a través de un receptor  $\alpha$  adrenérgico (Joasoo y Murray, 1975).

Los estudios de Melander y col., en el ratón han demostrado que la inyección de epinefrina y norepinefrina, aumenta el número de gotas de coloide y la liberación de  $^{131}I$  exclusivamente en animales tratados con  $T_4$  (Melander y Sundler, 1972; Melander y col., 1975b). En ausencia de dicho pretratamiento, ambas catecolaminas disminuyen la liberación de hormonas tiroideas, (Melander y col., 1972) o carecen de efecto (Ericsson y col., 1970).



Los efectos de las catecolaminas sobre la secreción tiroidea no se deben a cambios hemodinámicos ni a una disminución en la eliminación periférica, sino a una acción directa sobre la glándula (Melander, 1970).

En el ratón, la inyección de 6-hidroxidopamina, agente que es captado por los terminales nerviosos simpáticos, liberando norepinefrina de los terminales y destruyéndolos ocasionalmente, aumenta la secreción de hormonas tiroideas cuando se induce liberación de norepinefrina, mientras si se produce simpatectomía, la secreción disminuye (Melander y col., 1977).

La secreción de hormonas tiroideas está aumentada no sólo por una acción directa del sistema nervioso simpático sobre las células foliculares, sino también como consecuencia de una liberación por estimulación de la 5-hidroxitriptamina y de la histamina de los mastocitos intratiroideos, actuando estas aminas en las células foliculares, facilitando la secreción hormonal (Melander y col., 1971, 1973).

La administración intravenosa de dosis farmacológicas de epinefrina o norepinefrina a perros (Mowbray y Peart, 1960) u ovejas (Falconer, 1967) altera el flujo sanguíneo tiroideo sin modificar la secreción hormonal.

La discrepancia de los resultados puede deberse a las diferencias experimentales y a las diversas especies

de animales utilizados que poseen diferentes grados de inervación tiroidea. (Melander y col., 1975)

La epinefrina y dopamina estimulan la actividad de la adenilato ciclasa en células aisladas de tiroides bovina (Maayan y col., 1973).

Spaulding y Burrow (1975), demostraron que el isoproterenol causa un aumento en los niveles de AMPc y en la actividad de la proteinkinasa en cortes de tiroides bovina, siendo bloqueado este efecto por la preincubación con propranolol, resultados que fueron confirmados por Marshall y col., (1975). En cortes de tiroides canina la adición de epinefrina aumentó los niveles de AMPc y GMPc; el agregado de propranolol previno el efecto de la norepinefrina sobre los niveles de AMPc, pero no sobre los de GMPc.

Por el contrario, el agregado de fentolamina bloqueó los efectos de la norepinefrina sobre los niveles de GMPc, pero no sobre los de AMPc. El efecto de la norepinefrina sobre el GMPc era calcio dependiente, no así la estimulación de los niveles de AMPc. (Aiyoshi y col., 1978).

En cortes de tiroides provenientes de pacientes con la enfermedad de Graves, la norepinefrina causó un aumento en los niveles de AMPc, siendo bloqueado este efecto por el propranolol, no así por la fentolamina (Sato y col., 1976).

Aiyoshi y col., (1980) observaron que la norepinefrina aumentaba los niveles de AMPc en cortes de tumores tiroideos humanos, sin tener efecto alguno en los cortes de tiroides normales.

Hupka y Dumont (1963), observaron que la epinefrina y norepinefrina estimula la oxidación de glucosa-1- $^{14}\text{C}$  y glucosa-6- $^{14}\text{C}$ , resultados que fueron confirmados por Maayan y col., (1970,1973) al encontrar que en células de tiroides aisladas, la epinefrina estimuló la conversión de glucosa-1- $^{14}\text{C}$  a  $^{14}\text{CO}_2$  y la incorporación de leucina en proteínas y de uridina en ARN. Los efectos estimulatorios sobre el metabolismo de la glucosa eran inhibidos por el agregado de propranolol y fentolamina sobre el metabolismo del yodo por el agregado del bloqueante- $\alpha$  adrenérgico fentolamina, no teniendo efecto el bloqueante  $\beta$  adrenérgico propranolol, mientras que la estimulación sobre la síntesis de ARN no era abolida por ninguno de los bloqueantes.

Juvenal y col., (1978) observaron también un efecto estimulatorio de la norepinefrina sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN en cortes de tiroides bovina. La epinefrina también estimula la liberación de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_2$  pero no la de  $\text{TxB}_2$ ; estas estimulaciones fueron inhibidas por el agregado de dihidroergocriptina, lo que sugeriría el papel de un receptor  $\alpha$  adrenérgico. La ausencia de calcio anula los efectos estimulatorios de la epinefrina. (Boeynaems y col., 1979).

Las catecolaminas estimulan también la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato a fosfatidilinositol a través de un receptor  $\alpha_1$  adrenérgico. (Uzumaki y col., 1982)

Como se mencionó anteriormente, el efecto de las catecolaminas depende del tratamiento previo realizado por cuanto la TSH y las catecolaminas interactúan en sus acciones sobre la tiroides, pudiendo tener efectos aditivos o antagonistas dependiendo del esquema de tiempo de administración utilizado.

En animales pretratados con  $T_4$ , las catecolaminas y la TSH tienen efectos aditivos sobre la secreción de hormonas tiroideas cuando se inyectan simultáneamente, pero son mutuamente antagonistas si se administran con un intervalo de dos horas. (Melander y Sundler, 1972)

Maayan y col., (1977 a,b) confirmaron estos resultados trabajando con tiroides de ratón in vitro.

La epinefrina inhibe la acción de TSH sobre la liberación de hormonas tiroideas, no así el efecto de TSH sobre los niveles de AMPc. La epinefrina inhibiría la acción de la TSH a través de un receptor  $\alpha$  adrenérgico, estimulando la producción de AMPc a través de receptor  $\beta$  adrenérgicos. (Maayan y col., 1981)

Yamashita y col., (1977, 1979, 1980) y Sherwin y Mills (1980) encontraron que las catecolaminas inhiben

la acción de la TSH sobre los niveles de AMPc, actuando a través de un receptor  $\alpha_1$  adrenérgico.

Existe controversia en cuanto a la acción de bloqueantes adrenérgicos sobre la acción de la TSH. Zor y col., (1969b) encontraron que el propranolol disminuye la acción de la TSH sobre la oxidación de la glucosa, no teniendo efecto alguno el dicloroisoproterenol, otro agente  $\beta$  bloqueante, ni la fenoxibenzamina un bloqueador  $\alpha$  adrenérgico. Levey y col., (1969) y Burke (1969) encontraron que, tanto el propranolol como la fentolamina inhibían la acción estimuladora de la TSH sobre los niveles de AMPc y la oxidación de la glucosa. Juvenal y col., (1978) observaron que la fentolamina bloquea la estimulación de la síntesis de ARN por parte de la TSH, no teniendo efecto alguno el propranolol.

Yamashita y col., (1970) encontraron que el propranolol inhibe el efecto de la TSH sobre la acumulación de AMPc, resultados que fueron confirmados por Marshall y col., (1975, 1976), aunque las concentraciones necesarias de propranolol para inhibir la acción del isoproterenol son varios órdenes de magnitud menores que las que inhiben la acción de la TSH.

El isoproterenol no desplaza a la TSH de la unión a su receptor, indicando que funcionan independientemente el receptor para TSH del receptor  $\beta$  adrenérgico.

Trabajando con células de tiroides porcinas en cultivos, Dumas y col., (1982) observaron que la presencia de TSH en el medio de cultivo, desensibilizaba la célula a la acción del isoproterenol, debiéndose a una disminución en el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos.

Por lo mencionado anteriormente, cabe concluir que el sistema nervioso simpático tiene influencias directas sobre diferentes metabolismos tiroideos. Es posible que una hiperactividad simpática pueda precipitar el hipertiroidismo y/o aumentar los síntomas de esta enfermedad. (Melander y col., 1974c)

### 3.6. Autorregulación tiroidea:

El yodo y los compuestos yodados han sido utilizados, desde tiempos remotos, como hemos visto al comienzo de esta Introducción, para el tratamiento del bocio y del hipertiroidismo. Sin embargo, no se conocen aún las bases bioquímicas de su mecanismo de acción. Al conocerse que la TSH regula la función tiroidea, así como la interacción existente entre la tiroides y la hipófisis, se pensó que el yoduro, mediante la biosíntesis de las hormonas tiroideas, regulaba los niveles séricos de TSH. Hoy se sabe que además del mecanismo antedicho, el yoduro tiene efectos directos sobre la glándula.

La glándula tiroides depende del yodo para la síntesis de sus hormonas y dispone de una serie de mecanismos de adaptación a los niveles disponibles del yodo.

En esta sección se describirá el papel del yodo en la regulación tiroidea, mecanismo conocido como autorregulación.

a). Transporte y organificación del yodo:

Este aspecto ha sido el más estudiado (ver revisiones: Wolff, 1969; Halmi 1956; Ingbar 1972, 1978; Studer y Greer, 1968).

Halmi y col., (1953) encontraron que en ratas hipofisectomizadas tratadas con TSH, la captación de  $^{131}\text{I}$ , estaba aumentada por la administración de PTU. Vanderlaan y Caplan (1954), encontraron resultados similares en ratas hipofisectomizadas y sometidas a dietas pobres en yodo, sugiriendo estos autores que la respuesta de la bomba de yodo a la TSH, se encuentra aumentada cuando disminuye la concentración intratiroidea de yodo.

Halmi y Spirtos (1954, 1955) observaron que en ratas hipofisectomizadas, la administración de altas dosis de yodo (18 mg de I, como NaI por kg. de peso corporal) bloqueaba el aumento de la relación T/S producido por la TSH. Este efecto del yodo era anulado por el propiltiouracilo, lo que llevó a la conclusión que el efecto estimulador de la TSH sobre la bomba de yodo es bloqueado por un compuesto yodoorgánico intratiroideo.

Wollman y Reed encontraron que en ratones sometidos a dietas pobres en yodo, los altos valores de la relación T/S podían ser disminuídos por la administración de pequeñas dosis de yodo (75  $\mu\text{g/kg}$ ).

Dicho efecto era bloqueado por la administración previa de PTU.

Socolow y col., (1968) confirmaron los resultados anteriores, llegando a la conclusión que el compuesto yodoorgánico responsable de regular la captación del yoduro, no era ninguno de los aminoácidos principales yodados presentes en la glándula.

Gramer y col., (1963) trabajando in vivo con ratas, observaron que el pretratamiento con  $T_3$  disminuía el efecto de la TSH sobre el aumento de la incorporación de  $^{131}I$ .

En trabajos realizados in vitro, se ha podido observar efectos similares. Sherwin y Tong (1974), trabajando con células dispersas, demostraron que la preincubación con yodo disminuye la captación del mismo. Este efecto está asociado con un aumento en la constante de Michaelis, sin afectar la  $V_{max}$ , al contrario de la estimulación por parte de la TSH, donde se modifica la  $V_{max}$ . La preincubación con yodo bloqueaba los efectos estimulatorios de la TSH.

Berkowitz y col., (1981) confirmaron estos resultados y postularon que el exceso de yodo disminuye la dependencia de sodio del transporte de yodo. Esta pérdida en la dependencia del sodio, estaría asociada con un aumento en la afinidad por el sodio y una reducción en la afinidad del sistema de transporte por el yodo.



El yodo en exceso, no sólo regula el proceso de captación, sino también su metabolismo posterior.

Morton y col., (1944), en trabajos en cortes de tiroides ovinas, observaron que al incubar con dosis crecientes de yodo, se produce un aumento proporcional en la organificación del mismo, hasta llegar a una concentración crítica por encima de la cual existía una brusca disminución en el porcentaje de yodo organificado, fenómeno conocido como efecto Wolff y Chaikoff.

Estos últimos autores (1948a y b) confirmaron estos resultados trabajando in vivo. La administración de dosis altas de yodo, produjo un bloqueo agudo en la organificación, restableciéndose los valores normales, una vez disminuída la concentración plasmática e intratiroidea de yoduro. Este efecto depende de la concentración intratiroidea de yodo, más que la concentración plasmática del mismo. (Raben, 1949)

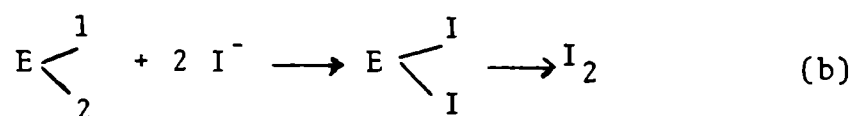
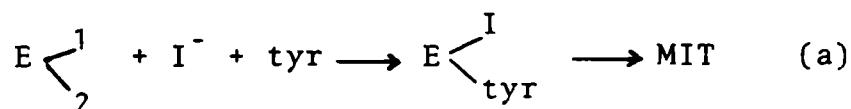
Durante el efecto Wolff y Chaikoff, cuando la cantidad de yodo organificada es mínima, existe un aumento en la relación MIT/DIT y la formación de yodotironinas está prácticamente bloqueada (Galton y Pitt Rivers, 1959; Nanyataki e Ingbar, 1964; Wolff y Chaikoff, 1948c). El coeficiente de sedimentación de la tiroglobulina disminuye de 19S a 15S, que es la característica de la tiroglobulina, pobremente yodada.

Trabajos de Shimoda y Greer (1966) demostraron que, cuanto mayor era el tiempo que se sometía a ratas a una dieta pobre en yodo, mayor era la cantidad de  $^{127}\text{I}$  incorporado a yodotironinas.

No se conoce bien el mecanismo del efecto Wolff y Chaikoff. Varias fueron las hipótesis postuladas. Serif y Kirkwood (1956), sugirieron que el exceso de yodo formaría el anión triyoduro  $\text{I}_3^-$ , que es incapaz de organificarse, teoría ésta que fue posteriormente refutada.

Fawcett (1968) ha postulado que el yodo en altas concentraciones reaccionaría con grupos sulfenilos yodados ( $\text{RSI}$ ), el cual sería un intermediario en las reacciones de yodinación. Nunez y Pommier (1982) postularon que la peroxidasa tiroidea tendría dos sitios, uno de los cuales formaría un radical libre  $\text{I}^\circ$  y el otro se uniría a un grupo tirosilo. La interacción posterior de estos dos sitios traería aparejada la formación de las yodotirosinas.

Un exceso de yodo bloquearía la unión del resto tirosilo (reacción b).



Estas dos reacciones tienen diferentes afinidades por el yoduro; las constantes de Michaelis para el I en la reacción (a) es  $8 \times 10^{-5}M$  y en la reacción (b) el  $K_m$  es de  $6 \times 10^{-3}M$ .

Taurog (1970) ha demostrado que el yoduro también inhibe a la peroxidasa en las reacciones de yodinación realizadas in vitro.

Ingbar (1972) sugirió que sería crítica una relación adecuada entre la concentración de yodo y la de una proteína yodada, posiblemente la tiroglobulina.

El bloqueo de la organificación por parte del yodo, es un efecto temporario. Este fenómeno de restauración de la organificación, a pesar de los niveles altos de yodo se lo ha denominado fenómeno de "escape" o "adaptación".

Wolff y Chaikoff (1948d), (1949) observaron que a pesar de mantener los niveles séricos con una alta concentración de yodo, ya sea por administración de una única dosis de yodo, seguida de nefrectomía o por inyecciones continuas, luego de 24-48 horas no se mantenía el bloqueo de la organificación.

Es conocida la dificultad de producir bocios experimentales por administración continua de yodo. En algunos casos, sin embargo, se ha observado que la administración de yodo produce bocios de tipo coloidal.

Braverman e Ingbar (1963) en trabajos in vitro, demostraron que en las tiroides de ratas sometidas a una dieta rica en yodo, durante catorce días, no se producía el efecto de Wolff y Chaikoff, aún preincubando con concentraciones altas de yodo. En estas dosis, el yodo orgánico era mayor en las ratas "adaptadas" y no había aumento en la relación MIT/DIT. Cuando se analizó el contenido de yodo intratiroideo, se lo encontró disminuido en las tiroides de los animales sometidos a dietas ricas en yodo.

Dichas concentraciones eran menores que las requeridas para inducir el efecto Wolff y Chaikoff en los animales controles. Cuando se estudió el transporte de yodo se encontró un bloqueo del mismo, en las tiroides de ratas adaptadas. Por lo tanto, la explicación del fenómeno de escape o adaptación residiría en que, como consecuencia de una disminución en la bomba de yodo, el contenido intratiroideo del mismo no sería suficiente como para inducir el efecto Wolff y Chaikoff, a pesar de las altas concentraciones plasmáticas de yoduro.

Nagataki y col., (1966) observaron que la administración crónica de yodo en altas concentraciones, puede inducir el fenómeno de Wolff y Chaikoff. En este caso el mecanismo de acción sería a través del yodo intratiroideo acumulado por simple difusión. Estos autores no encontraron diferencia alguna en la metabolización periférica de la  $^{131}\text{I-T}_4$  en los diferentes grupos experimentales, llegando a la conclusión que en los animales sometidos a dosis

excesivas de yodo, la tiroides liberaría rápidamente un compuesto yodoorgánico diferente de las yodotironinas.

b). Secreción de Hormonas Tiroideas:

La administración terapéutica de yodo para aliviar la tirotoxicosis en pacientes, que se conocía desde el siglo pasado, fue introducida por Plummer en 1923, desconociéndose aún el mecanismo de la acción del yodo.

Greer y col., (1956) surgieron que el yoduro podía inhibir la secreción de TSH. En 1957 Benua y Lippset, estudiaron seis (6) pacientes hipofisectomizados y observaron que en uno de ellos, la administración de yodo bloqueaba el efecto estimulador de la TSH sobre la liberación de  $^{131}\text{I}$  de la tiroides.

En la enfermedad de Graves, la administración de yodo reduce la liberación de  $^{131}\text{I}$  (Goldsmith y col., 1956, 1958). Años más tarde, Green e Ingbar (1962) observaron que en pacientes con nódulos autónomos tiroideos, la administración de una solución de Lugol bloqueó el efecto de la TSH sobre la liberación de  $^{131}\text{I}$  y de la  $\text{T}_4$  antes y después de la extirpación del nódulo tiroideo, habiéndose inhibido previamente la secreción de tirotrofina por inyecciones diarias de  $\text{T}_3$ .

En pacientes con tirotoxicosis, debido a bocios difusos multinodulares, dosis farmacológicas de yodo disminuyeron las concentraciones séricas de  $\text{T}_4$ , excluyéndose un posible efecto sobre el metabolismo de la hormona. (Wartofsky y col., 1970)

En sujetos normales, la administración de 72-360 mg de yodo por día durante un mes, provocó la disminución de las concentraciones séricas de  $T_4$  y  $T_3$ , seguida de un aumento en la liberación de TSH, con lo cual se normalizó la función tiroidea. (Vagenakis y col., 1973)

Han sido numerosos los estudios realizados sobre este aspecto de la autorregulación tiroidea en animales de experimentación. Yamada y col., (1963) observaron que la administración de KI bloqueaba la liberación tiroidea de  $^{131}\text{I}$ , si el animal era pretratado con dosis pequeñas de PTU, no observándose efecto alguno si se aumentaban las dosis de PTU administradas, o en ausencia del mismo. El mismo grupo (Onaya y col., 1966) confirman sus resultados, observando que la administración previa de  $\text{KClO}_4$  bloquea los efectos del yodo, llegando a la conclusión que el efecto del mismo es directo sobre algunos de los procesos químicos o enzimáticos activados por la TSH, hipótesis no compartida por Mouriz y col., (1966), quienes sugirieron que el efecto inhibitorio del yoduro sería a través de la acción de las hormonas tiroideas a nivel hipofisario.

Onaya y Halmi (1967) observaron en ratas hipofisectomizadas pretratados con PTU en dosis no bloqueantes de la organificación, que el KI inhibe la liberación de  $^{131}\text{I}$  tiroideo inducida por TSH, fortaleciendo la hipótesis de una acción directa del yodo sobre la tiroides. Yamada Y.

Lewis (1968) confirman sus resultados anteriores, experimentando con animales tratados con dosis elevadas de tiroxina y diferentes concentraciones de TSH, eliminando además una posible acción del yoduro por mecanismos de dilución isotópica. Estos mismos autores postularon que el pretratamiento con pequeñas dosis de PTU o MMI produciría un aumento en la liberación de TSH y ésta aumentaría la concentración de yodo intratiroideo responsable del efecto regulatorio.

Ochi y De Groot (1969) demostraron que el KI inhibe los efectos estimulatorios de la TSH y del LATS (Long Acting Thyroid Stimulator).

Pisarev y col., (1971) observaron que el IK no sólo bloquea el efecto estimulatorio de la TSH sobre la secreción de  $^{131}\text{I}$  tiroideo, sino también el del AMPc, postulando que el efecto del yoduro sería distal a la formación del AMPc. La administración de imidazol, metilmercaptoimidazol, tiouracilo y tiourea inhibieron la respuesta a la TSH, debiéndose probablemente a un efecto de los agentes bociógenos sobre la fosfodiesterasa.

En trabajos realizados in vitro, las tiroides de ratones pretratados con  $\text{T}_3$  durante diez (10) días, no respondieron al efecto de la TSH sobre el aumento de la secreción de  $\text{T}_4$  y  $\text{T}_3$ . (Gagni y col., 1975)

Yukimura y col., (1976), por el contrario, observaron que el exceso de yodo estimulaba la secreción de hormonas tiroideas en ratas hipofisectomizadas, siendo este efecto bloqueado por la administración de metilmercaptoimidazol. Los autores postularon que el exceso de yodo estimula la formación de AMPc, aún en ausencia de TSH.

De Robertis, en 1941, fue el primero en sugerir la proteólisis de la tiroglobulina, como uno de los procesos regulados por el yodo. En pacientes tratados con yodo (De Robertis, 1946), al igual que en animales de experimentación (Takeuchi y col., 1970; Pisarev y Altschuler, 1973), se ha observado una disminución de la actividad proteásica tiroidea. Yamamoto y col., (1972) y Ohtake y col., (1973) observaron que el yodo bloquea el aumento en la formación de gotas coloidales inducida por TSH, sugiriendo los autores que el yodo podría actuar a nivel de la generación de AMPc.

Shishiba y col., (1975) observaron que en ratones tratados con  $T_3$ , estaba inhibida la estimulación por TSH, de la formación de gotas de coloides, no así la generación de AMPc. Shimizu y Shishika (1975) confirmaron estos resultados trabajando in vitro, postulando que el yodo o la  $T_3$  "per se" inhiben la formación de gotas coloidales en una etapa posterior a la formación de AMPc, lo que coincide con lo postulado por Pisarev y col., (1971).



Starling y Hopps (1980) observaron que en ratas tratadas con exceso de yodo, las enzimas lisosomales tiroideas catepsina D y  $\beta$  glucuronidasa estaban disminuídas, no así las enzimas lisosomales hepáticas.

Lamas y col., (1982) sugirieron que la autorregulación no estaría mediada por una reducción de las enzimas lisosomales, sino que ocurriría a nivel de la formación de vacuolas endocíticas.

c). Sistema Adenilatociclasa-AMPC:

Varios son los trabajos en los cuales se ha demostrado que el yoduro o compuestos yodados inhiben la formación de AMPC. De ahí que algunos autores postulen este sistema como el sitio principal de regulación por parte del yoduro.

Van Sande y Dumont (1973) encontraron que el yoduro inhibe la acción de la TSH sobre los niveles de AMPC, siendo bloqueado este efecto por la adición de  $\text{NaClO}_4$ , MMI y PTU, lo que indicaría que el yoduro ejerce su acción a través de un compuesto intracelular y organificado. Estos resultados fueron confirmados por varios autores, trabajando in vitro (Sherwin y Tong, 1975; Van Sande y col., 1975; Pisarev y Aiello, 1976; Pochet y col., 1977; Sherwin, 1978).

Por el contrario, Burke (1970) observó que el NaI en concentraciones  $10^{-5}\text{M}$  a  $10^{-3}\text{M}$ , estimulaba la adenilatociclasa.

Rappoport y col., (1975) observaron que en ratas hipofisectomizadas, la estimulación en la concentración de AMPc por parte de la TSH, era mayor en aquellos animales sometidos a dietas pobre en yodo, resultados que fueron confirmados por Saddok y col., (1978); Rappoport y col., (1976); Hashizume y col., (1976); Agrawal y Furth (1972 ).

Gafni y col., (1975) observaron que el tratamiento in vivo con  $T_3$  reduce el efecto de la TSH sobre los niveles de AMPc.

El efecto del yoduro sería a nivel de la síntesis de AMPc, sin afectar su degradación (Van Sande y col., 1977), ni la actividad de su fosfodiesterasa (Rappoport y col., 1975; Saddok y col., 1978; Van Sande y col., 1977; Pochet y col., 1977). Estos últimos autores postularon que el yoduro actuaría sobre la unidad catalítica de la adenilato-ciclasa; por el contrario Rappoport y col., (1976) no encontraron efecto alguno sobre la estimulación de la adenilato-ciclasa por el NaF.

En cortes de tiroides de pacientes con la enfermedad de Graves, la inhibición del yodo y las yodotironinas a la respuesta de la TSH fue menor que en cortes de tejido normal. (Takasu y col., 1974); resultados contrarios a los obtenidos por Uchimura y col., (1980) quienes observaron mayor efecto del yoduro en tiroides normales. La diferencia puede deberse al tratamiento preoperatorio a que fueron sometidos los pacientes.

Rotella y col. (1981,1982) observaron que las hormonas tiroideas inhiben la acumulación de AMPc dependiente de TSH en células de tiroides humanas en cultivo, pero no la actividad de la adenilato ciclasa.

La tiroglobulina bloquea la estimulación de la TSH sobre la adenilato ciclasa de tiroides humanas. (Alterini y col., 1980; Shinozawa y col., 1980; Bech y col., 1981). Burke y Szako (1972), por el contrario observaron que la tiroglobulina estimuló el contenido de AMPc.

Se ha demostrado también que la tiroglobulina se une específicamente a membranas tiroideas y que ésta desplaza a la TSH de su receptor. (Hashizume y col., 1978; Tanini y col., 1981). Altas concentraciones de tiroglobulina en sueros de pacientes con la enfermedad de Graves interfirieron la unión de las inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides (TSI) a su receptor. (Fenzi y col., 1979).

Por el contrario, Clarck y col., (1982) no observaron efecto alguno de la tiroglobulina en la unión de la TSH a su receptor, en membranas de tiroides normales y neoplásicas.

Uchimura y col., (1979) no observaron alteración alguna en la unión de la TSH en tiroides de ratas tratadas in vivo o in vitro con yodo.

Kielczynski y Nauman (1978) observaron que las hormonas tiroideas inhibieron la unión de la TSH a membranas de tiroides humanas, resultados que no pudieron ser confirmados por Goldenheim y col., (1979) trabajando con membranas de tiroides bovina.

Nagasaka e Hidaka (1976) encontraron que la  $T_3$  y la  $T_4$  inhibieron la fosfodiesterasa de AMPc y en menor grado la fosfodiesterasa de GMPc.

Friedman y col., (1978) observaron que la  $T_3$  inhibe la proteinquinasa, dependiente de AMPc, postulando un efecto sobre la subunidad catalítica. El pretratamiento con  $T_3$  disminuyó la actividad de las fosfoquinasas dependientes de AMPc en tiroides de rata. (Delbauffe y Pavlovic-Hournac, 1976)

d). Metabolismo intermedio:

Algunos autores han postulado que la acción del yodo sobre la función tiroidea, podría explicarse como consecuencia de una acción a nivel del metabolismo intermedio.

Anderson y Evans (1937) observaron que el exceso de yodo disminuye o bloquea el efecto estimulador de la TSH sobre el consumo de oxígeno, resultados que fueron confirmados por Vanderlaan y col., (1941) y por Burke (1968).

Galli Mainini, en 1941, observó que las hormonas tiroideas inhiben la acción estimuladora de la TSH sobre el consumo de oxígeno en cortes de tiroides, postulando que la glándula tiroides podría ser inhibida directamente por su propia hormona.

Dumont (1961), realizando experiencias in vitro con tiroides de cordero, observó un efecto directo del yoduro ( $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ M) estimulando la oxidación de la glucosa-1- $^{14}$ C y en menor grado el de la glucosa-6- $^{14}$ C. Green e Ingbar (1963) observaron que el NaI en concentraciones de  $10^{-4}$ M, aumentaron el consumo de  $O_2$  y la oxidación de glucosa, no observándose efecto alguno con altas concentraciones ( $5 \times 10^{-2}$ M). La adición de agentes bloqueantes de la organificación del yodo (MMI y tiouracilo) inhibieron la respuesta estimuladora del yoduro. Estos autores postularon que el efecto estimulador del yoduro sobre la oxidación de la glucosa resulta de un aumento en la oxidación de coenzimas reducidas, producto de la oxidación y subsiguiente reducción del yoduro.

Jarret y Field (1964) pudieron observar un efecto estimulador del yoduro sobre la oxidación de glucosa en cortes de tiroides ovinas, pero no observaron efecto alguno en tiroides de rata, bovina y canina.

Green (1966) observó que concentraciones altas de yoduro ( $5 \times 10^{-2}$ M) disminuyen el consumo de oxígeno, la oxidación de la glucosa, la glícolisis y la oxidación de piruvato y acetato. Por el contrario, dosis de  $10^{-4}$ M estimulan el consumo de oxígeno y la oxidación de la glucosa. Los efectos estimuladores del yoduro fueron bloqueados por el agregado de MMI (Green, 1970). Este autor sugirió que los efectos de las altas dosis de yoduro sobre el metabolismo tiroideo podría estar relacionado con la inhibición en la hormogénesis causada por un aumento agudo en la

concentración extracelular de yodo in vivo.

Burke (1968a) encontró que el yoduro bloqueó el efecto estimulatorio de la TSH sobre la oxidación de glucosa -1- $^{14}\text{C}$  y sobre la incorporación de  $^{32}\text{P}$  en fosfolípidos, no encontrando efecto alguno en la estimulación por parte del LATS sobre los mismos parámetros. El mismo autor (1968b) observó también que las yodotirosinas aumentaron la oxidación de la glucosa, siendo menor el efecto causado sobre la fosfolipogénesis. El MIT y el DIT potenciaron la estimulación causada por TSH sobre la oxidación de la glucosa pero no la producida por LATS. Por el contrario, las yodotirosinas no alteraron la estimulación de la incorporación de  $^{32}\text{P}$  por parte de la TSH y el LATS.

Lamy y col., (1967) encontraron que la tiroxina estimulan la actividad de la ATPasa en mitocondrias de tiroi-des sin tener efecto alguno sobre la respiración, a diferencia de las mitocondrias de hígado, en las cuales la tiroxina estimuló su respiración.

Maayan e Ingbar (1970b) observaron que la administración del yoduro en ratas disminuía el contenido de ATP y piridin nucleótidos, bloqueándose el efecto por el perclorato de sodio y tioicinato de sodio, pero no por el propiltiouracilo. El yoduro no tuvo efecto alguno sobre el contenido de ATP y piridin nucleótidos en hígado. Los autores sugirieron que un aumento en el transporte del yoduro podría bloquear la organificación, disminuyendo la concentración de piridin nucleótidos que intervienen en la organificación del yodo.

Ogata y col., (1972) encontraron que el yoduro provocaba una oxidación de los piridin nucleótidos al igual que la TSH; pero la administración de yoduro, 12 horas antes de la TSH, bloqueaba los efectos de ésta última.

Yu y col., (1976) encontraron que el pretratamiento con hormonas tiroideas bloqueó la inducción por parte de la TSH de la ornitina decarboxilasa en tiroides de rata. Observaron también que el pretratamiento con NaI bloqueó el efecto estimulatorio de la TSH sobre esta enzima, únicamente en ratones sometidos a dieta pobre en yodo.

El tratamiento en ratas con metiltiouracilo produjo un aumento en la actividad de la ornitina decarboxilasa y en el contenido de putrescina, espermidina y espermina. La administración de yoduro bloqueó este aumento. (Matsuzaki y col., 1978). Friedman y col., (1979) encontraron que el pretratamiento con hormonas tiroideas no tenía efecto alguno sobre la estimulación de la ornitina decarboxilasa por parte de la TSH en ratas hipofisectomizadas.

e). Crecimiento y Diferenciación:

Chapman, en 1941, fue uno de los primeros en sugerir que el yoduro, independientemente de la hipófisis, podría afectar la estructura de la glándula tiroides. Chapman observó que las tiroides de ratas hipofisectomizadas sometidas a dietas pobres en yodo, durante 55 días, pesaban más y que la altura de las células foliculares eran mayores

que las de tiroides en ratas sometidas a dietas con un contenido normal en yodo. Sin embargo, sus resultados no son convincentes y fueron cuestionados. Halmi (1954), con un tiempo de observación menor (25 días) no pudo reproducir lo observado por Chapman.

Cortell y Rawson (1944) observaron que la administración de  $T_4$  a cobayos y a ratas hipofisectomizadas, disminuyó la respuesta tiroidea a la TSH exógena tomando como parámetro la altura celular del epitelio tiroideo.

Bray (1968) observó que la administración de dosis bajas de TSH a ratas hipofisectomizadas produjo un aumento mayor en el peso tiroideo en ratas sometidas a DPY + PTU, que en aquellas sometidas a DPY únicamente. La adición de PTU o  $KClO_4$  a la dieta durante el tratamiento con TSH no produjo alteración en la bociogénesis. Bray sugirió que la disminución de yodo intratiroideo, puede resultar en un aumento del peso tiroideo aún con niveles normales de TSH.

Astwood y Bissele (1964) observaron que el PTU no alteró el efecto bociógeno de la TSH. Por el contrario, Halmi y Spirtos (1955) observaron únicamente un aumento en la altura del epitelio tiroideo, en ratas hipofisectomizadas, si al tratamiento con TSH se le adicionaba PTU.

Albert y col., (1947) encontraron que el tiouracilo potenció los efectos de la TSH, y Alexander y Wolff (1966) observaron que la TSH produjo un aumento de peso tiroideo mayor en ratas que habían recibido PTU.



Naeije y col., (1978) confirmaron los resultados de Bray. Estos autores observaron que ratas sometidas a dietas pobre en yodo desarrollaron bocios, antes de que los niveles circulantes de TSH estuvieran elevados. El aumento del peso tiroideo se comenzó a observar luego de diez (10) días de tratamiento, cuando el contenido intratiroideo de yodo era de 150 ng/mg peso tiroideo, aproximadamente diez (10) veces menor que los valores normales de yodo intratiroideo. (1.100 ng/mg peso tiroideo)

Matsuzaki y col., (1978) observaron resultados similares, al someter ratas a un tratamiento con metiltiouracilo y diferentes dosis de yoduro de potasio. Los animales cuyo contenido intratiroideo de yodo orgánico era bajo, desarrollaron bocio aún con niveles normales de TSH.

La administración de KI inhibió la acción bociógena de la TSH en ratas hipofisectomizadas (Katakai y col., 1966). Realizando trabajos in vivo, Pisarev e Itoiz (1972) observaron que el tratamiento con KI bloqueó los efectos estimulatorios de la TSH, del AMPc y del GMPc sobre la incorporación de aminoácidos en proteínas y sobre el crecimiento tiroideos. En ratones sometidos a dietas pobre en yodo durante cinco (5) semanas, se produjo una reducción del 50% del peso tiroideo luego de cuatro (4) horas de la administración de KI, sin haber variado los niveles séricos de TSH. (Valenta y col., 1982).

Heywood (1966) encontró que la incorporación de aminoácidos a proteínas estaba aumentada en las tiroides de ratas

sometidas a dietas pobre en yodo, respecto a las sometidas a dietas normales. La tiroxina produjo un efecto inhibitorio únicamente en las ratas alimentadas con DPY. El KI inhibió también la incorporación de aminoácidos a proteínas, pero su sensibilidad fue diferente; en tiroides de ratas sometidas a DPY se produjo una inhibición del 50% con una concentración de  $10^{-6}M$ , mientras que se necesitó  $10^{-4}M$  para producir el mismo efecto en los controles. El efecto del KI no fue alterado por la adición de PTU 0,1 mM.

Valenta (1974) encontró que el yoduro inhibió la incorporación de aminoácidos a proteínas de tiroides de ratas. No hubo efecto del KI sobre la captación de los aminoácidos por los lóbulos tiroideos.

Pisarev y Aiello (1976) confirmaron estos resultados en cortes de tiroides bovina. El KI ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}M$ ) produjo una inhibición del 50% en la incorporación de  $^3H$ -leucina a proteínas. La adición de  $KClO_4$  o de MMI bloquearon el efecto del KI. El efecto inhibitorio del yoduro sobre la captación de leucina por los cortes de tiroides, fue insignificante (11-15%). La incorporación de  $^{14}C$  galactosamina a la fracción ATA precipitable o a la tiroglobulina, no fue alterada por la adición de KI. Estos resultados fueron confirmados por Glowacka y col., (1981).

Yu y col., (1976) observaron que el pretratamiento con  $T_4$  y  $T_3$  disminuye el efecto de la TSH exógena sobre la síntesis proteica.

El KI inhibe la incorporación, basal y la estimulada por TSH y nucleótidos cíclicos, de  $^{32}\text{P}$  y  $^3\text{H}$ -uridina en ARN tiroideo, no afectando la captación de la uridina, el pool de precursores radiactivos ni la degradación del ARN. (Pisarev y col., 1976; Kleiman de Pisarev y col., 1978). Medeiros-Neto y col., (1975) observaron una disminución del ARN tiroideo, luego de la administración de aceite yodado a pacientes con bocio.

Murthy y Mc Kenzie (1974) observaron que en las tiroides de ratas sometidas a dietas pobre en yodo se encontraba aumentada la actividad de un inhibidor de la ribonucleasa. (Ver Rev. Nagataki, 1974; Pisarev, 1981; Wolff, 1976)

### 3.7.- Otros factores de Regulación:

Existen otros tipos de regulación en condiciones fisiológicas y/o patológicas.

El hecho de que existan algunas diferencias en la función tiroidea, o una mayor incidencia de patologías tiroideas en la mujer, respecto del hombre, ha llevado a realizar estudios para dilucidar la posible participación del sistema reproductivo en la regulación de la función tiroidea.

La ovariectomía y la orquiectomía en diferentes especies, no producen variaciones significativas en la función tiroidea.

Los estrógenos tienen efectos sobre la cinética de las hormonas tiroideas, aumentan la concentración de su proteína transportadora (TBG) y aumentan el yodo unido a proteínas séricas (PBI). (Ingbar y Freinkel, 1960; Robbins y Rall, 1957). Zaninovich y col., (1982) observaron que dosis farmacológicas de estrógenos inhiben la secreción tiroidea y sugirieron que los estrógenos podrían actuar directamente sobre la glándula tiroides.

La gonadotrofina coriónica (hCG) podría tener participación en la regulación de la función tiroidea. (Ver revisiones de Hershman, 1981 y Amir e Ingbar, 1983)

La hCG posee actividad tirotrófica (Nisula y col., 1974; Kenimer y col., 1975; Taliadouros y col., 1978), se une a receptores ubicados en la membrana tiroidea (Azukizawa y col., 1977; Carayon y col., 1980a; Pekonen y Weintraub, 1980; Amir y col., 1981) activando la adenilato ciclasa y los niveles de AMPc (Silverberg y col., 1978; Carayon y col., 1980b). Los pacientes con coriocarcinomas que presentan altas concentraciones séricas de hCG, poseen una hiperactividad tiroidea (Odell y col., 1963; Cohen y col., 1970; Davies y col., 1979; Nisula y Taliadouros, 1980).

Durante las semanas 9 y 16 del embarazo, los niveles circulantes de hCG serían equivalentes a  $3-10 \mu$  U de TSH. Estos niveles de hCG podrían contribuir a aumentar la actividad tiroidea y producir un leve aumento en las concentraciones libres de  $T_3$  y  $T_4$ . (Harada y col., 1979).

Los efectos de los andrógenos sobre la TBG y el PBI son opuestos a los de los estrógenos (Keitel y Sherer, 1957; Engbring y Engstrom, 1959). No se sabe aún si los andrógenos pueden tener participación directa en la regulación de la función tiroidea.

La administración de cortisona (100 mg o más por día) disminuye la acumulación de yodo radiactivo (Berson y Yalow, 1952), desconociéndose su mecanismo de acción. Se ha sugerido que los glucocorticoides afectan la secreción de TSH actuando, ya sea a nivel hipotalámico como hipofisario (Otsuki y col., 1975). Sin embargo en el hipertiroidismo, con niveles bajos de TSH, los glucocorticoides disminuyen la captación de  $^{131}\text{I}$  y el yodo unido a proteínas (PBI). (Wikhoem y Einhorn, 1963)

En los trabajos con células en cultivo es primordial el agregado de insulina y glucocorticoides para el crecimiento y mantenimiento de las células foliculares. (Nataf y Chaikoff, 1965; Dickson, 1966; Singh y Chaikoff, 1966; Colle-Vandervelde y Elewaut, 1971). La insulina tendría efectos directos sobre la glándula tiroidea. Nataf y col., (1972) encontraron que esta hormona estimula la captación de yodo y de su organificación en glándulas mantenidas en cultivo. Singh y col., (1965) observaron también un efecto estimulador de la insulina sobre la síntesis de ARN y de proteínas, resultados que fueron confirmados por Brisson-Lougarre y col., (1978, 1979) en cortes de tiroides canina.

La administración de insulina en ratas pretratadas con  $\text{KClO}_4$  más PTU, que poseían un pequeño bocio, resultó en un aumento del peso tiroideo, mientras que no se observó efecto alguno si la insulina se la administraba junto con glucosa. (Jolin y col., 1970)

Jolin y col., (1974) postularon la participación de la glándula adrenal, a través de la corticosterona en el mecanismo por el cual la insulina aumenta el peso tiroideo en ratas tratadas con bociógenos, sin afectar los niveles circulantes de TSH.

Ching y col., (1975) y Jolin y col., (1973) sugirieron que la hormona de crecimiento podría tener participación en la regulación de la función tiroidea. La somatostatina, además de regular la secreción de TSH (Vale y col., 1974; Weeke y col., 1975; Arimura y Schally, 1976), podría actuar directamente sobre la glándula tiroides. Se ha demostrado la presencia de células productoras de somatostatina en la glándula tiroides. (Arimura y col., 1975; Hökfelt y col., 1975). Ahrén y col., (1977) han encontrado que la administración de somatostatina a ratones, bloqueó el efecto estimulatorio de la TSH, de la isoprenalina y del AMPc sobre la secreción tiroidea.

Otros factores, como estado nutricional, infecciones, edad, enfermedades, etc., pueden alterar la función tiroidea. (Ver revisión de Gregerman y Davis, 1978).

#### 4 .- OBJETIVOS DE LOS PRESENTES TRABAJOS.

De los trabajos mencionados precedentemente, resulta evidente la existencia de diversos sistemas que regulan el funcionamiento de la glándula tiroides.

El yodo tiene una acción inhibitoria sobre distintos parámetros tiroideos. En lo que respecta a su acción regulatoria del crecimiento glandular, ésta se encuentra íntimamente vinculada a la inhibición de la síntesis de ARN, demostrada en trabajos previos. (Pisarev y col., 1971, 1972, 1976, 1978). En dichos trabajos se había determinado que el yodo inhibe la síntesis de ARN tiroideo; que éste se debe transformar en un compuesto orgánico e intracelular y que las hormonas tiroideas reproducen esta acción.

Con el objeto de estudiar una posible acción directa de  $T_3$  y  $T_4$  sobre la tiroides, se ha tratado de responder a los siguientes interrogantes:

- a). ¿Las hormonas tiroideas, actúan "per se" o son transformadas a otro yodocompuesto?.
- b). ¿Penetran las hormonas tiroideas exógenas dentro de la tiroides y cuáles son las características de esta entrada?.
- c). ¿Cuáles son los grupos funcionales que tienen importancia en la molécula de yodotironinas para la manifestación de su acción biológica?.

- d). ¿Existen sitios específicos para la acción de las yodotironinas?.
- e). ¿Hay alguna explicación a los resultados discrepantes obtenidos por algunos autores, con referencia a la acción inhibitoria del yodo y yodocompuestos?.

Por otra parte, las diferentes investigaciones previas efectuadas para aclarar el papel del sistema simpático en la regulación de la función tiroidea, ofrecen resultados contradictorios. Una de las principales objeciones a la mayoría de los estudios realizados es que, en general, se utilizan dosis farmacológicas de las catecolaminas o sus agonistas o antagonistas, lo que aumenta la posibilidad de efectos no fisiológicos de las mismas. Asimismo, las catecolaminas inyectadas sistemáticamente serían capaces de afectar la función tiroidea, no sólo mediante una acción directa sobre esta glándula, sino también aumentando la velocidad de recambio ("turnover") de las hormonas tiroideas en la periferia (Dratman, 1978), la secreción de TSH hipofisaria (Morley, 1981) o el flujo sanguíneo tiroideo (Galton, 1965).

Dado que la inervación simpática de la glándula tiroidea se origina en el ganglio cervical superior (GCS), es posible manipular las aferencias neurales mediante la simpatectomía quirúrgica de las fibras o del ganglio.



Uno de los objetivos del presente trabajo es estudiar la influencia de la simpatectomía cervical uni o bilateral, aguda o crónica, sobre diversos aspectos de la función tiroidea, incluyendo la respuesta a la acción bociógena del MMI y de la TSH, concentración sérica de TSH,  $T_3$  y  $T_4$ , síntesis tiroidea de ARN, receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos y contenido tiroideo de catecolaminas.

Se estudiará también la posible interrelación entre el sistema simpático y el sistema autorregulatorio.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

## II. MATERIALES Y METODOS

### 1.- EXPERIMENTOS REALIZADOS CON RATAS.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 140-240 g de peso, mantenidas bajo un régimen de iluminación de 14 hs. diarias de luz (07.00 a 21.00 hs.) en ambiente climatizado ( $22 \pm 2^\circ$  C) y alimentadas con alimento balanceado y agua "ad libitum".

En los experimentos de Gx aguda, los animales fueron mantenidos durante 24 hs. en un cuarto iluminado; este procedimiento produce supersensibilidad a la norepinefrina en por lo menos uno de los territorios inervados por el GCS (la glándula pineal). (Cardinali, 1981)

#### 1.1.- TRATAMIENTOS EFECTUADOS:

##### a). Gangliectomía cervical superior:

La gangliectomía cervical superior (Gx) u operación simulada, fue realizada bajo anestesia etérea a distintos tiempos antes del sacrificio, según la siguiente técnica: (Cardinali y col., 1976): se expusieron las glándulas salivales mediante una incisión ventral y se las retrajo con el objeto de exteriorizar los músculos suprahioideos; cada GCS fue identificado en la bifurcación carotídea entre sus ramas externa e interna. En los animales en los que se efectuó la Gx bilateral, ambos ganglios fueron totalmente resecados, mientras que en los animales con operación simulada la inspección fue sólo visual. Cuando se realizó Gx unilateral, sólo se resecó el GCS del lado derecho.

b). Pinealectomía:

La pinealectomía o pinealectomía simulada se realizó mediante la siguiente técnica (Kuszack y Rodin, 1977): luego de la anestesia etérea se excavó con un torno dental una ventana en la calota sobre la confluencia del seno venoso longitudinal con los laterales, procediéndose a ligar y seccionar el seno longitudinal a unos 0,5 cm de dicha confluencia. La retracción del muñón posterior venoso permitió la visualización de la glándula pineal, la que fue extraída con una pinza de relojero tipo Bruselas N° 7, o abandonada en su posición sin modificación en el caso de la operación simulada. No hubo mortalidad por este procedimiento quirúrgico y los animales se recuperaron normalmente dentro de los 20-30 min. luego de la cirugía. No se detectó la presencia de restos pineales en el momento de la autopsia.

c). Inducción de bocio:

Con el objeto de producir un bocio experimental, se inyectaron las ratas con el agente bociógeno MMI en dosis de 4 mg por día durante 4 días (Gx bilateral). La droga se administró por vía intraperitoneal disuelta en 0,5 ml de solución salina, iniciándose las inyecciones a distintos tiempos luego de la Gx o pinealectomía. Los animales fueron sacrificados 24 hs. luego de la última inyección de MMI, determinándose el peso de la glándula tiroides y obteniéndose una muestra de sangre para la determinación de TSH sérico.

En otros grupos de animales, el bocio se produjo mediante la inyección sistémica de TSH. Se utilizó TSH de origen bovino (TSH-NIH-B9) en dosis de 100 mU/día, durante 4 días.

## 1.2.- DETERMINACION DE HORMONAS Y CATECOLAMINAS:

### a). Hormonas tiroideas en sangre:

Se obtuvieron muestras de suero de los animales en el momento del sacrificio. La determinación de  $T_3$  y  $T_4$  totales se realizó por radioinmunoanálisis, según la técnica descrita por Chopra (1972). Los reactivos se obtuvieron de Radioassay System Laboratory, Carlson, Ca (USA) y los resultados se expresaron como ng de  $T_3$  o ng de  $T_4$  por dl de suero.

La concentración de  $T_4$  sérica libre se determinó por radioinmunoanálisis utilizando un reactivo comercial (Amerlex, The Radiochemical Center, Amersham, Inglaterra). Los niveles de  $T_4$  libre dependen no sólo de la  $T_4$  total circulante, sino también de la capacidad de unión de las proteínas transportadoras suéricas y son un parámetro sensible de la función tiroidea. (Oppenheimer y Surks, 1974). La  $T_4$  libre se expresó como ng/ml suero.

### b). Determinación de los niveles séricos de TSH:

La concentración sérica de TSH se determinó por radioinmunoanálisis con los reactivos provistos por el Rat Pituitary Hormone Distribution Program (NIAMDD).

Los resultados se expresaron en ng de TSH-RP-1 por ml de suero. La sensibilidad del ensayo fue 10-20 ng.

c). Determinación de catecolaminas endógenas:

El contenido de norepinefrina, epinefrina y dopamina del tejido tiroideo, se determinó por un método radioenzimático. (De Prada y Zürcher, 1976). Estos procedimientos se basan en la transformación de las catecolaminas a sus derivados O-metilados, por medio de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) que transfiere el grupo metilo radiactivo de la 5-adenosil-1-metionina (SAM) al núcleo catecólico.

La COMT se obtuvo de hígado de rata y se purificó parcialmente por una modificación del método de Nikodejevic y col., (1979). La preparación de la enzima tenía una concentración de proteínas de aproximadamente 50mg/ml y una actividad específica de 800-900 nmol producto/mg proteína/hora, valorada por una modificación del método de Mc Caman. (1965)

Cada glándula tiroides o sus lóbulos se homogeneizaron en ácido perclórico 0.3 N y se centrifugaron en frío. Una alícuota del sobrenadante se incubó a 37° C, durante 60 min. con una mezcla de solución de buffer Tris-HCl-EGTA pH 9.6, Mg Cl<sub>2</sub>, COMT y <sup>3</sup>H-SAM. Los derivados O-metilados obtenidos: normetanefrina, metanefrina y metoxitiramina se extrajeron con una mezcla de tolueno: alcohol isoamílico (3:2 v/v) y se reextrajeron

con HCl 0,1 N. Luego de la centrifugación se descartó la fase orgánica y la fase acuosa se sembró en placas de sílica gel. Las placas se corrieron en un sistema de solvente de cloroformo:etanol:etilamina (16:3:2). Luego de visualización con luz ultravioleta, las zonas correspondientes se eluyeron en viales. La metanefrina se derivó a  $^3\text{H}$ -vainillina mediante oxidación con periodato de sodio según lo describieron Peuler y Johnson (1977). La  $^3\text{H}$ -vainillina se extrajo en tolueno-omnifluor para el conteo en contador de centelleo líquido.

d). Contenido endógeno de hormonas tiroideas:

El contenido de tiroxina ( $\text{T}_4$ ) y triyodotironina ( $\text{T}_3$ ) en cada lóbulo tiroideo fue medido por radioinmunoensayo, luego de homogeneizar cada lóbulo en 0,5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 conteniendo PTU 1 mM; 0,3 ml del homogenato fueron digeridos durante 24 hs. a  $37^\circ\text{C}$  con 0,2 ml de una suspensión de pancreatina 2% en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, se agregaron  $10\mu\text{l}$  de  $\text{Mn SO}_4$  0,1M y  $20\mu\text{l}$  de PTU 1% y gotas de tolueno. Los resultados fueron expresados como nanogramos/mg de peso tiroideo.

1.3.- CAPTACION DE  $^{86}\text{Rb}$ :

Con objeto de estimar el flujo sanguíneo glandular se recurrió al procedimiento de  $^{86}\text{Rb}$  utilizado en otros órganos (Goldman, 1967; Goldman y Nikitovich-Winer, 1969).

La captación del isótopo 2 min. después de su administración sistémica por vía yugular (10-100  $\mu$ Ci, disuelto en 0,25 ml de solución salina), se estudió en animales sometidos a Gx u operación simulada 14 hs. ó 7 días antes.

La radiactividad presente en la glándula tiroides, pineal, adenohipófisis, hipotálamo mediobasal y en una muestra de sangre se determinó en un espectrómetro gamma automático. Los resultados se expresaron como relación "tejido/suero" o como cpm/mg de tejido. En un experimento piloto, se observó que la captación del isótopo radiactivo por la tiroides y pineal, alcanza un "plateau" al minuto de inyección y permanece en este nivel durante por lo menos 1 min. más.

#### 1.4.- INCORPORACION DE $^3\text{H}$ -URIDINA AL ARN TIROIDEO:

La síntesis de ARN tiroideo se estimó mediante la medición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina al ARN. Cada lóbulo tiroideo se cortó en trozos con una hoja de afeitar y se incubó a 37°C en Krebs Ringer bicarbonato, con glucosa, bajo una atmósfera de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de 30 min. de incubación con agitación, se agregó a cada recipiente de incubación una dosis trazadora de  $^3\text{H}$ -uridina ( $^3\text{H}$ -5-uridina, 28.3 Ci/mmol, New England Nuclear, USA). Habitualmente se utilizó una concentración de 3  $\mu$ Ci/ml. Las incubaciones se continuaron durante 60 min. más y al cabo de este período las glándulas se lavaron cuidadosamente 3 veces con solución salina fría.



Se procedió luego a homogeneizarlas en 1 ml de agua destilada, con un homogeneizador de tejido tipo Potter Elvehjem con pistón de vidrio. El ARN se extrajo de acuerdo al método de Munro y Fleck (1966) descripto por Pisarev y col., (1976) para el tejido tiroideo. Brevemente, a 1ml del homogenato se le agregaron 0,5 ml de ácido perclórico (APC) 0,5 N se agitó y se dejó reposar en frío por 3 min. El precipitado obtenido por centrifugación a 3000 rpm durante 20 min. a 4°C se lavó dos veces con APC 0,2 N.

El precipitado así obtenido se resuspendió en 1 ml de HOK 0,3 N e incubó a 37°C durante 1 hora. La hidrólisis alcalina se detuvo por el agregado de 0.6 ml de APC 0.6 N. Se agitó y se dejó reposar en frío por 30 min., centrifugando luego a 3000 rpm durante 20 min. La densidad óptica del sobrenadante se midió a 260 nm comparándose con una curva patrón de ARN de levadura. La radiactividad de una alícuota (habitualmente 0.2-0.3 ml) se midió, previo agregado de solución de Bray, en un contador de centelleo líquido. Se calcularon tanto los  $\mu\text{g}$  de ARN como las dpm/ml de cada muestra, determinándose así la actividad específica.

#### 1.5.- RECEPTORES ADRENERGICOS $\alpha$ Y $\beta$ :

Los estudios de la asociación de ligandos radiactivos a los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  tiroideos

fueron realizados de acuerdo a técnicas ya establecidas. (Williams y Lefkowitz, 1978).

Se utilizaron como ligandos la  $^3\text{H}$ -dihidroergocriptina ( $^3\text{H}$ -DHE) (25.7 Ci/mmol, New England Nuclear) para los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y el  $^3\text{H}$ -dihidroalprenolol ( $^3\text{H}$ -DHA) (51.1 Ci/mmol) para los  $\beta$ -adrenérgicos. Una fracción  $\text{P}_2$  de glándulas tiroides de animales sometidos a Gx u operación simulada 7 días antes, fue preparada con homogeneización del tejido en buffer Tris-HCl 75 mM y  $\text{Cl}_2$  Mg 25 mM, pH 7.4, centrifugación a 900 g, 10 min. (dos veces) y centrifugación final a 33000 g. 20 min. El precipitado final fue resuspendido en Tris-HCl 75 mM,  $\text{Cl}_2$  Mg 25 mM. Como competidores específicos de la asociación del ligando radiactivo a los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos, se utilizaron fentolamina y propranolol respectivamente.

En todos los experimentos se realizó una serie de blancos de reactivos para cada concentración del compuesto radiactivo. Las incubaciones se efectuaron en las condiciones óptimas, establecidas previamente (30 min. a 25°C para los receptores adrenérgicos- $\alpha$ ; 10 min. a 37°C para los receptores adrenérgicos- $\beta$ ). La separación del compuesto unido del libre se efectuó por el procedimiento de filtración rápida en papel de fibra de vidrio Whatman GFB en vacío.

En el caso de los estudios con  $^3\text{H}$ -DHE, el papel fue previamente embebido en una solución de buffer que contenía dopamina 5 mM, pirocatecol 1 mM, pirogalo 1 mM, 0.1 % de ácido ascórbico y 0.1 % de albúmina. Luego de un lavado del filtro con 10 ml de buffer frío, la radiactividad presente en el papel se determinó por espectrometría de centelleo líquido, utilizándose Tritón x 100 como detergente.

La diferencia entre la radiactividad unida total y la unida en presencia del competidor (unión inespecífica) permitió el cálculo de la unión específica. Las constantes de equilibrio de la asociación de ambos radioligandos a los sitios receptores, se calcularon por análisis de Scatchard. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col., (1951)

#### 1.6.- CAPTACION DE $^{131}\text{I}$ POR LA TIROIDES:

Se estudió in vivo. Las ratas recibieron una dosis trazadora de 10  $\mu\text{Ci}$  de  $^{131}\text{I}$  en 0.5 ml de solución salina isotónica y se sacrificaron 60 min. más tarde. La glándula tiroides se disecó, pesó y su radiactividad se midió en un contador gamma automático. Los resultados se expresaron como la relación:  $\text{cpm. mg tiroides}^{-1} / \text{cpm. ml suero}^{-1}$ .

### 1.7.- METABOLISMO DEL $^{125}\text{I}$ :

Se estudió el metabolismo de  $^{125}\text{I}$  luego de 24 hs. de inyectado ( $10\mu\text{Ci}$  ip). Los lóbulos tiroideos fueron cuidadosamente disecados, pesados y homogeneizados, tal como se describe en 1.2.d. Se sembraron alícuotas de la digestión con pancreatina en papel Whatman N° 1 y se realizó una cromatografía ascendente (22 hs.) en el sistema n-butanol:etanol:hidróxido de amonio 1N (5:1:2,v/v).

Los yodocompuestos fueron identificados por el revelado de las tiras con 0,5 % de cloruro de paladio y 0,5 % de ninhidrina en acetona. Se cortó cada tira y se contó su radiactividad.

### 1.8.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS:

Los resultados de los experimentos sobre los efectos de la Gx o pinealectomía sobre la respuesta bociógena, se analizaron con un análisis de varianza factorial seguido por un test de  $\underline{t}$  modificado. (Snedecor y Cochran, 1967). Las pendientes e intercepciones de los gráficos de Scatchard, se calcularon por análisis de regresión seguido por análisis de covarianza. (Snedecor y Cochran, 1967).

Los resultados de los experimentos sobre captación de  $^{86}\text{Rb}$ , niveles de catecolaminas y síntesis de ARN, se analizaron por el test de  $\underline{t}$  de Student. En los otros estudios se empleó un análisis de varianza seguido por el test de Scheffé, o un análisis factorial de varianza seguido por un test de  $\underline{t}$  modificado.

## 2.- EXPERIMENTOS REALIZADOS CON TIROIDES BOVINAS.

### 2.1.- OBTENCION DEL TEJIDO:

Las tiroides bovinas eran obtenidas en el matadero, inmediatamente de sacrificado el animal y transportadas hasta el laboratorio, en solución salina isotónica fría. Cada lóbulo fue disecado, preparándose cortes de tejido con un micrótopo manual tipo Stadie-Riggs. (A. Thomas, USA).

Cada corte tenía un peso húmedo de alrededor de 40-80 mg. Si bien los cortes se preparaban a 4° C, se encontró que los resultados eran similares si el procedimiento se realizaba a temperatura ambiente, siempre que se colocaran rápidamente en KRB a 4°C.

### 2.2.- COMPOSICION DEL MEDIO DE INCUBACION:

Los cortes de tiroides bovina fueron incubados en medio de Krebs:Ringer:bicarbonato, compuesto de: NaCl 124mM; KCl 5mM; Mg SO<sub>4</sub> 1,25mM; CaCl<sub>2</sub> 1,45 mM; KPO<sub>4</sub>H 25,3 mM; glucosa 8mM.

La solución de KRB era preparada fresca el día del experimento y antes de ser utilizada era gaseada durante 30 minutos, con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.3.- CONDICIONES DE INCUBACION:

En general se colocaban unos 4 cortes de tiroides en un frasco con capacidad de 30 a 40 ml, conteniendo 10 ml de KRB. El tejido era preincubado a 37°C durante 30-60 minutos,

con las diferentes sustancias cuya acción se deseaba estudiar. Luego de la preincubación se agregaba al medio de incubación el marcador radiactivo, se gaseaba 30 segundos y se continuaba la incubación 60 minutos más.

Al finalizar la incubación, los frascos se colocaban en hielo, sacando rápidamente los cortes de tiroides de cada uno de ellos, los que eran lavados con solución salina fría.

#### 2.4.- INCORPORACION DE $^3\text{H}$ -URIDINA A ARN TIROIDEO:

Los cortes de tiroides eran incubados en KRB a  $37^\circ\text{C}$ , en presencia de las sustancias cuya acción se deseaba estudiar. Luego de 30 ó 45 minutos se agregaba una dosis trazadora de  $^3\text{H}$ -uridina ( $2\mu\text{Ci/ml}$ ) y la incubación se continuaba durante 60 minutos más, procediendo luego como se describió en 1.4.-

#### 2.5.- CAPTACION DE $^{125}\text{I}$ $\text{T}_3$ POR CORTES DE TIROIDES:

Los cortes de tiroides bovina fueron cuidadosamente disecados para liberarlos de grasa y tejido conectivo. Fueron incubados en KRB durante 30-45 minutos, con glucosa 8mM, conteniendo las diferentes sustancias, cuya acción se deseaba estudiar. Al final de este período se agregaba una dosis trazadora de  $^{125}\text{I}$ - $\text{T}_3$  (aproximadamente unas 800.000 cpm) y, previo gaseado, se continuaban las incubaciones por diferentes tiempos de hasta 60 minutos. Al finalizar este período, los cortes fueron lavados con solución salina, secados sobre un papel de filtro, pesados y contada su radiactividad. Se tomó una alícuota del medio

de incubación y su radiactividad fue, asimismo, contada.

La relación tiroides/medio (T/M) fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T/M = \frac{\text{cpm tiroides/g peso húmedo tiroideo}}{\text{cpm/ml de medio}}$$

## 2.6.- METABOLISMO DE $^{125}\text{I}$ -TRIYODOTIRONINA POR CORTES DE TIROIDES:

Con el objeto de estudiar el metabolismo de la  $T_3$  en la tiroides, se realizaron estos experimentos. Los cortes fueron incubados esencialmente de igual forma que cuando se estudió la síntesis de ARN. La pureza de la  $T_3$  marcada fue controlada antes de cada experimento por cromatografía en papel. Los cortes fueron incubados con una dosis trazadora de  $^{125}\text{I}$ - $T_3$  (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  cpm/ml). Al final de la incubación, los cortes fueron lavados, secados y homogeneizados en 0,5 ml de una solución 1mM de PTU. Alícuotas del homogenato fueron sometidos, al igual que el medio de incubación, al análisis cromatográfico en papel Whatman N° 1, utilizando  $T_3$ ,  $T_4$ , MIT, DIT y IK como testigos.

Se utilizaron tres diferentes sistemas de solventes:

- a). n-butanol:etanol:hidróxido de amonio 1 N (BEA) (5:1:2; v/v), ascendente; b). n-butanol:ácido acético; agua (BAA) (38:5:6; v/v), ascendente y c). hexano:alcohol amílico terciario: hidróxido de amonio 2N (HAA) (1:5:6, v/v) descendente. (Bellabarba y col., 1968)

El tiempo de desarrollo fue de 20 horas aproximadamente en todos los casos. Los yodocompuestos fueron identificados por el revelado de las tiras con 0,5 % de cloruro de paladio y 0,5 % de ninhidrina en acetona. Se cortó cada tira y se contó su radiactividad. La distribución porcentual de la radiactividad fue calculada por cada compuesto. Dado que los sistemas BEA y BAA no resuelven completamente  $T_3$  y  $T_4$ , éstos fueron estimados conjuntamente en esos sistemas. Otro tanto sucedió con MIT y DIT en HAA.

## 2.7.- DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA $[^{125}\text{I}] T_3$ :

Con el objeto de estudiar la distribución subcelular de la  $^{125}\text{I}-T_3$  en la tiroides, se incubaron por cuatriplicado, aproximadamente 2-3 gramos de cortes de tiroides con una dosis trazadora de  $^{125}\text{I}-T_3$  (aproximadamente  $1\mu\text{Ci/ml}$ ) con o sin el agregado de  $T_3$  fría  $10^{-6}\text{M}$ . La incubación se realizó en buffer KRB durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y al finalizar, los cortes fueron lavados, secados y homogeneizados en una relación 1:5 (p/v) de solución SMT (sacarosa 0,32M,  $\text{Mg Cl}_2$  1 mM. Tris-HCl 20 mM pH 7,8) más PTU 1 mM, usando un homogeneizador de vidrio con pistón de teflón. (A. Thomas, USA). Todas estas operaciones se realizaron en frío.

El homogenato se filtró a través de tres capas de gasa y se centrifugó a  $1000 \times g$ , durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

El sobrenadante se centrifugó a  $20000 \times g$  durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El precipitado nuclear se resuspendió en



12 ml de una solución de sacarosa 2,2 M,  $\text{Mg Cl}_2$  1 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,1 mM centrifugándose a 50000 x g, durante 60 minutos a 4°C.

Al final de la ultracentrifugación, el precipitado se resuspendió, en forma manual, en 2 ml de solución SMCT (sacarosa 0,32M,  $\text{Mg Cl}_2$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, DTT 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,8) usando un pistón de teflón. Se completó a 5 ml con la misma solución y se agregó 0,25 ml de una solución de Tritón x-100 al 10%. Se agitó la suspensión y se centrifugó a 250 x g, durante 5 minutos a 4°C.

El precipitado se volvió a resuspender en 5 ml de SMCT, sin el agregado de tritón x-100 y se centrifugó a 250 x g, durante 5 minutos a 4°C.

Se tomó una alícuota de cada fracción y se contó su radiactividad, determinándose el porcentaje presente en cada fracción.

## 2.8.- PRESENCIA DE PRODUCTOS YODADOS EN NUCLEOS DE TIROIDES

### A PARTIR DE $^{125}\text{I}$ :

Se incubaron por cuadruplicado 2 a 3 gramos de cortes de tiroides en medio KRB con 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$  ó  $^{131}\text{I}$ , durante 60 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación, se lavaron los cortes y luego de secados fueron homogeneizados en una relación 1:5 (p/v) de solución SMT. Se obtuvieron diferentes fracciones subcelulares, tal como se describió en 2.7.-

Se tomaron alícuotas de cada fracción y se contó su radiactividad, determinándose el porcentaje correspondiente a cada fracción. Alícuotas de los núcleos purificados, fueron cromatografiados directamente o luego de digestión con pancreatina, tal cual se describió en 2.6.-

Para estudiar la posible contaminación nuclear, se realizaron tres tipos de experimentos: a). se procedió de igual forma que la descrita, con excepción de la incubación que se realizó a 0°C; b). los cortes se incubaron sin trazador, luego de 60 minutos se agregó el yodo radiactivo procediéndose inmediatamente al lavado y homogeneizado, tal como se describió anteriormente; c). se incubaron paralelamente cortes de tiroides con y sin yodo radiactivo a 37°C, durante 60 minutos. Al finalizar la incubación, los cortes fueron lavados, homogeneizados y centrifugados a 1000 x g, 15 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se recompusieron los homogenatos totales, intercambiando los sobrenadantes. Luego de un intensivo mezclado, se volvió a centrifugar a 1000 x g durante 15 minutos, continuándose tal como se describió anteriormente.

## 2.9.- UNION DE $\left[^{125}\text{I}\right] \text{T}_3$ A NUCLEOS AISLADOS:

### a). Obtención de los núcleos:

Los cortes de tiroides fueron lavados en solución SM (sacarosa 0,32M,  $\text{Mg Cl}_2$  1 mM) a fin de eliminar restos de

sangre y se homogeneizaron en solución SM en una relación 1:5 (p/v). Las operaciones se realizaron en frío. El homogenato se filtró a través de tres capas de gasa y se continuó tal como se describió en 2.7.-

El precipitado nuclear fue resuspendido en solución SMT (sacarosa 0,32 M,  $MgCl_2$  1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,8), luego de retirar una alícuota para la determinación de ADN, se añadió DTT (concentración final 2 mM).

La pureza nuclear fue controlada por microscopio de contraste de fase.

b). Determinación de la constante de asociación y del número de sitios de unión para la triyodotironina en núcleos de tiroides:

Se siguió la técnica de Bernal y De Groot (1977) y Bernal y col., (1978) con ligeras modificaciones. Con 0,4 ml de la suspensión nuclear (aproximadamente  $80\mu g$  de ADN correspondiente a 200 mg de tejido original), se incubaron con 0,5 ml de una concentración fija de  $[^{125}I] T_3$  (actividad específica  $3300\mu Ci/\mu g$ , aproximadamente  $8 \times 10^{-11}$  M final) disuelta en solución SMT más DTT 2 mM final, y concentraciones crecientes de  $T_3$  no radiactiva. El volumen final de incubación fue de 1 ml. La incubación se efectuó a  $20^\circ C$  con agitación constante durante 2 horas. Al cabo de dicho tiempo, se enfrió a  $0^\circ C$  y se centrifugó a  $1000 \times g$ ,

durante 5 minutos, a 4°C. Luego de aspirar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió con 2 ml de solución SMCT más Tritón x 100 al 0,5 % y se volvió a centrifugar a 1000 x g durante 5 minutos.

Se aspiró el sobrenadante y se midió la radiactividad del precipitado nuclear. A todos los valores se les sustrajo la radiactividad unida en presencia de  $T_3$  no marcada  $10^{-6}M$ . Las constantes de equilibrio de la asociación de la  $T_3$ , así como el número de sitios, se calculó por análisis de Scatchard (1949). La concentración de ADN fue calculada por el método de Burton (1956).

c). Efectos de la acción enzimática:

Se estudió la acción de diversas enzimas sobre la unión de la  $T_3$  a los núcleos tiroideos. Las enzimas estudiadas fueron: tripsina, proteasa, DNasa y RNasa. Las enzimas se disolvieron en buffer SMT más DTT 2mM. Las concentraciones finales fueron de 100  $\mu$ g/ml para la tripsina y la proteasa y de 50  $\mu$ g/ml para la DNasa y RNasa.

d). Obtención de extractos nucleares:

Una vez incubados los núcleos (correspondientes a 0,5 gr de tejido) con  $^{125}I - T_3$  (aproximadamente 900.000 cpm) en la forma ya descripta, se centrifugaron y luego de contarse la radiactividad del precipitado nuclear, se lo sometió a una extracción con diferentes soluciones y condiciones, tal como se describe en la tabla 14 . Se usó

una relación de 2 ml de solución de extracción por gramo de tejido original. Durante la extracción se sometió a las suspensiones a agitaciones con vortex durante 15 segundos a intervalos de 5 minutos. (Silva y col.,1977).

Luego de la extracción se centrifugó a 20.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Con 0,5 ml del sobrenadante se trataron con 0,2 ml de una suspensión de carbón-dextrán (1g de Norit A y 0,1g de dextrán en 100 ml de solución Tris-HCl 20mM pH 7,8). La suspensión se dejó 10 minutos a 0°C., sometiéndola durante ese período a 3 agitaciones de 10 segundos cada una. Se centrifugó luego a 1000 x g durante 5 minutos a 4°C. Se separó una alícuota del sobrenadante y se midió su radiactividad, determinándose el porcentaje de  $T_3$  unida, como se observa en la Tabla 14. Las mejores condiciones de extracción fueron en las que se empleó KCl 0,4M, Mg Cl<sub>2</sub> 3mM, EDTA 2mM, mercaptoetanol 5mM, glicerol 10% en Tris-HCl 20 mM pH 7,8 durante 60 minutos a 0°C.

e). Filtración en gel del extracto nuclear:

Se incubaron los núcleos purificados con  $^{125}\text{I}-T_3$ , tal como se describió en 2.9 d. y se extrajeron las proteínas nucleares, de acuerdo al siguiente procedimiento: el precipitado nuclear obtenido luego de la incubación, fue resuspendido en una solución de KCl 0,4M, Mg Cl<sub>2</sub>, 3mM, EDTA 2mM mercaptoetanol 5mM, glicerol 10% en Tris-HCl 20 mM, pH 7,8 (2 ml de solución por gramo de tejido original).

La extracción se efectuó a 0°C, agitando con vortex durante 15 segundos cada 5 minutos. Luego de 60 minutos la suspensión se centrifugó a 20000 x g, durante 20 minutos a 4°C. Con 0,5 ml del sobrenadante se sembraron en una columna de 2,5 ml de Sephadex G-25 (medium), equilibrada con la solución. Se utilizó la misma solución para la elución y se recogieron fracciones de 0,3 ml. Se contó la radiactividad de cada fracción y se midió luego la densidad óptica a 280 Mm.

#### 2.10.- OTRAS DETERMINACIONES:

El yodo total presente en homogenatos de cortes de tiroides fue determinado de acuerdo con el método de Zak, modificado por Enriori (1962), en tanto que el contenido de proteínas fue determinado según Lowry y col., (1951).

#### 2.11.- ANALISIS ESTADISTICOS DE LOS DATOS:

Fue realizado con el test de significación estadística de Student.

### REACTIVOS UTILIZADOS

ARN de levadura, ADN, nucleótidos cíclicos, ouabaina, cicloheximida, tiroxina, triyodotironina, diyodotirosina, monoyodotirosina, dinitrofenol, ninhidrina, albúmina. Sigma Chemical Co, USA.

Triac, tetrac, diyodotironina, isopropildiiodotironina e isopropiltriyodotironina: donación de Smith, Kline & French, Labs. USA.

Los otros yodocompuestos utilizados fueron provistos generosamente por los Dres. Vivian Cody, Medical Foundation of Buffalo, USA y Gerald N. Burrow, Toronto General Hospital, Canadá.

Propiltiouracilo: donación de Laboratorios Gerardo Ramón Argentina.

Metilmercaptoimidazol: Sigma Chemical Co, USA y donación de Laboratorios Glaxo, Argentina.

Actinomicina D: obsequio de Merck, Sharp & Dhome Labs, New Jersey, USA.

TSH bovina: donación de la National Pituitary Agency, USA.

### PRODUCTOS RADIATIVOS:

$^{131}\text{I}$ : libre de portador, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

$^{125}\text{I}$ : libre de portador: New England Nuclear, USA.

$\left[5-^3\text{H}\right]$  - Uridina=actividad específica, 28 Ci/m mol, New England Nuclear, USA.

L-3,5,3'  $^{125}\text{I}$ -Triyodotironina= actividad específica,  
144 $\mu$  Ci/ $\mu$ g, y 1200 $\mu$  Ci/ $\mu$ g, New England  
Nuclear, USA.

$^{86}\text{Rb}$ : Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina.

$\left[^3\text{H}\right]$  dihidroergocriphina=actividad específica 25,7 Ci/m mol,  
New England, USA.

$\left[^3\text{H}\right]$  dihidroalprenolol=actividad específica 51,1 Ci/m mol,  
New England Nuclear, USA.

S- $\left[^3\text{H}\right]$  adenosil-L-Metionina=actividad específica 55-85  
Ci/m mol, New England Nuclear, USA.



## R E S U L T A D O S

## RESULTADOS

### 1.1.- RELACION ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE YODOCOMPUESTOS:

Con el objeto de obtener información acerca de la relación entre la estructura química de los compuestos yodados y su acción inhibitoria sobre la biosíntesis de ARN, se realizaron estudios utilizando derivados de las hormonas tiroideas. En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos. Del total de compuestos utilizados fueron inhibitorios: L-tiroxina; L-triyodotironina; L-tetraclorotironina; L-3,3',5-triclorotironina; ácido L-tetrayodotiroacético; ácido L-triyodotiroacético; ácido L-tetrayodotiropropiónico; L-3,3',5-ácido triyodotiropropiónico; L-3'-isopropil-3,5,5'-triyodotironina; L-3,5 -dimetil-3'-isopropil tironina. Tuvieron una leve acción del ácido tetrayodotirofórmico y la L-3,5 -dimetil-3'-secbutil tironina. No fueron inhibitorios el ácido L-3,3',5-triyodotirofórmico; L-3,3'-diyodotironina y L-3'-isopropil-3,5-diyodotironina.

### 1.2.- INFLUENCIA DEL PTU Y DEL MMI SOBRE LA ACCION DE $T_3$ Y $T_4$ :

Como puede observarse en la figura 8, la tiroxina, en una concentración de  $10^{-5}M$ , produjo una significativa disminución en la incorporación de  $^3H$ -uridina a ARN. Este efecto no fue alterado por la adición de MMI, en una concentración de  $10^{-3}M$ , al medio de incubación.

TABLA 2

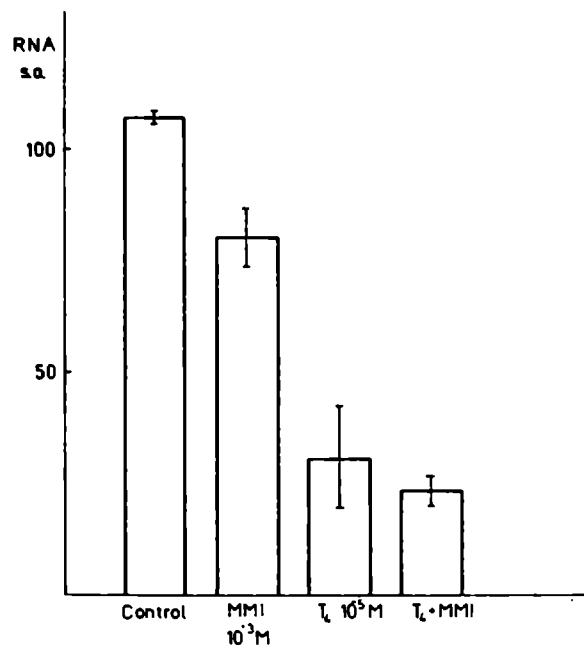
RELACION ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA  
DE DERIVADOS DE HORMONAS TIROIDEAS.

Compuesto	ARN % inhib.act.esp.
L-3,3',5-triyodotironina	59
L-tiroxina	44
L-tetraclorotironina	54
L-3,3',5-triclorotironina	37
ácido L-3,3',5-triyodotiroacético	60
ácido L-tetrayodotiroacético	47
ácido L-3,3',5-triyodotirofórmico	0
ácido L-tetrayodotirofórmico	23
ácido L-3,3',5-triyodotiropropiónico	52
ácido L-tetrayodotiropropiónico	65
L-3,3'-diyodotironina	0
L-3'-isopropil-3,5-diyodotironina	0
L-3'-isopropil-3,5,5'-triyodotironina	50
L-3,5 -dimetil-3'-isopropil tironina	61
L-3,5 -dimetil-3'-secbutil tironina	13

El porcentaje de inhibición fue calculado del promedio de inhibición de 8 experimentos diferentes. En cada experimento se incubaron 4 cortes de tiroides con cada compuesto en una concentración de  $10^{-5}$ M.

FIGURA 8

INFLUENCIA DEL METILMERCAPTOIMIDAZOL EN LA ACCION DE  
LA TIROXINA SOBRE LA SINTESIS DE ARN.



Los cortes fueron preincubados por 40 minutos en presencia de tiroxina y/o MMI a las concentraciones que se indican. El ARN fue marcado por la adición de una dosis trazadora de  $3H$ -uridina durante 60 minutos. Cada valor es el promedio de cuatro cortes  $\pm$  1 D.S. Todos los grupos son estadísticamente diferentes de los controles. ( $p < 0.0005$ )

También se analizó la influencia del PTU, bloqueante de la organificación del yodo y de la deshalogenación periférica de  $T_4$  a  $T_3$ , sobre la acción inhibitoria de las yodotironinas sobre la síntesis de ARN. En la tabla 3, se muestra que esta acción inhibitoria de las hormonas tiroideas no es afectada por la presencia de PTU, en una concentración de  $10^{-3}M$ .

### 1.3.- IMPORTANCIA DEL CONTENIDO TIROIDEO DE YODO EN LA MODULACION DE LA RESPUESTA AL YODO EXOGENO:

El efecto inhibitorio del yoduro sobre la síntesis de ARN fue observado sistemáticamente durante 4 años en cortes de tiroides bovina. Hubo, sin embargo, unos pocos experimentos en que el IK inhibió completamente la síntesis de ARN estimulada por TSH, sin afectar los valores basales. Vale decir que estas tiroides mostraban una sensibilidad parcial a la acción inhibitoria del yoduro. Cuando se determinó el contenido total de yodo en cortes totalmente y parcialmente sensibles al yodo exógeno, se encontró una diferencia altamente significativa, como se observa en la figura 9.

### 1.4.- METABOLIZACION DE $\left[^{125}I\right]-T_3$ POR CORTES DE TIROIDES:

La posible metabolización de la triyodotironina marcada fue estudiada bajo las mismas condiciones experimentales, bajo las cuales las  $T_3$  inhibe la síntesis de proteínas y de ARN. Como se puede observar en la tabla 4, luego de 60 minutos de incubación, solamente un pequeño

TABLA 3

INFLUENCIA DEL PTU SOBRE LA ACCION

INHIBITORIA DE  $T_3$  Y  $T_4$

Tratamiento	ARN dpm/mg	% Inhib.	p <
Testigos, solv. PTU	968 $\pm$ 133		
Testigos, solv. yodotironina	967 $\pm$ 178		
PTU $10^{-3}$ M	979 $\pm$ 187		
$T_3$ $10^{-6}$ M	263 $\pm$ 17	73	0.001
$T_4$ $10^{-6}$ M	539 $\pm$ 144	45	0.005
$T_3$ + PTU	341 $\pm$ 91	65	0.0005
$T_4$ + PTU	489 $\pm$ 22	50	0.0005

Cada valor es el promedio de cuatro cortes tiroideos  $\pm$  1 D.S. Resultados similares fueron obtenidos en 7 experimentos adicionales.

TABLA 4

METABOLISMO DE TRIYODOTIRONINA POR CORTES DE TIROIDES

	B:E:A				B:A:A				H:AAt:A			
	(Distribución % en cada cromatograma)											
	Tejidos		T <sub>3</sub> <sup>*</sup>	M	Tejidos		T <sub>3</sub> <sup>*</sup>	M	Tejidos		T <sub>3</sub> <sup>*</sup>	
	Control	PTU			Control	PTU			Control	PTU		
MIT	2.1 ± 0.6	1.0 <sup>+</sup> 0.3	0.4	1.1	0.9 <sup>+</sup> 0.0	1.0 <sup>+</sup> 0.1	0.9	1.6	{ 2.1 <sup>+</sup> 0.3	2.4 <sup>+</sup> 1.5	0.2	
DIT	1.7 ± 0.5	0.3 <sup>+</sup> 0.1	0.3	0.4	3.5 <sup>+</sup> 0.4	2.9 <sup>+</sup> 0.3	3.0	2.2				
T <sub>3</sub>	{ 90.1 ± 1.3	95.5 <sup>+</sup> 1.0	95.7	95.1	{ 91.9 <sup>+</sup> 1.1	94.0 <sup>+</sup> 0.4	94.2	94.3	90.2 <sup>+</sup> 1.1	91.8 <sup>+</sup> 1.9	95.1	
T <sub>4</sub>										3.7 <sup>+</sup> 1.1	2.7 <sup>+</sup> 0.2	3.5
I <sup>-</sup>	4.6 ± 1.0	2.2 <sup>+</sup> 0.5	2.9	3.0	2.7 <sup>+</sup> 0.7	1.5 <sup>+</sup> 0.2	1.6	1.7	4.0 <sup>+</sup> 0.3	3.0 <sup>+</sup> 0.3	1.2	
Origen	2.5 ± 0.4	1.0 <sup>+</sup> 0.3	0.6	0.4	1.1 <sup>+</sup> 0.5	0.7 <sup>+</sup> 0.3	0.3	0.3				

En cada experimento se incubaron 4 cortes de tiroides en KRB, con y sin PTU 1mM. Los homogenizados, la 125-I-T<sub>3</sub>(T<sub>3</sub>)\* y una alícuota del medio de incubación fueron analizados por cromatografía en papel con los tres sistemas de solventes indicados. M=medio de incubación; T<sub>3</sub>\*=125-I-T<sub>3</sub>. Cada valor es el promedio de cuatro determinaciones - 1 D.S. BEA=butanol:etanol:amonio; BAA= butanol:acético:agua; HAA=hexano:alcohol terciario:amonio-

porcentaje de la hormona (menos del 5%) es deshalogenada siendo este proceso inhibido por la adición de PTU,  $10^{-3}M$ .

#### 1.5.- ENTRADA DE LA TRIYODOTIRONINA A LA CELULA:

Sabiendo que, bajo estas condiciones, no se produce una deshalogenación significativa de la  $^{125}I-T_3$ , se decidió realizar estudios sobre la entrada de la hormona a la célula tiroidea y sus características.

Como se puede observar en la figura 10, existe una buena correlación entre la captación de la  $T_3$  marcada y el peso del tejido tiroideo.

La figura 11, muestra la captación de la  $T_3$  marcada por cortes de tiroides a diferentes tiempos de incubación y a dos temperaturas:  $37^{\circ}C$  y  $0^{\circ}C$ . Cuando las incubaciones se realizaron a  $37^{\circ}C$  hubo un rápido aumento de la relación T/M, de alrededor de 2 al minuto y 14 a los 60 minutos. Se observa una meseta de los valores a los 20 minutos. Cuando los cortes se incubaron a  $0^{\circ}C$ , los valores del T/M fueron un 25-30% de los obtenidos a  $37^{\circ}C$ .

En la figura 12 se observa la liberación de la  $T_3$  marcada a diferentes tiempos, luego de un pulso de 60 minutos.

El agregado de  $T_3$  fría disminuye la captación de la  $T_3$  marcada. En la figura 13 se observa que la  $T_3$  en concentraciones de  $10^{-9}M$  a  $10^{-5}M$ , produjo una progresiva disminución de la entrada de la hormona marcada, medida al minuto de pulso.



FIGURA 10

CORRELACION ENTRE LA CAPTACION DE  $^{125}\text{I-T}_3$  Y PESO DEL  
TEJIDO TIROIDEO.     $r^2 = 0,917$

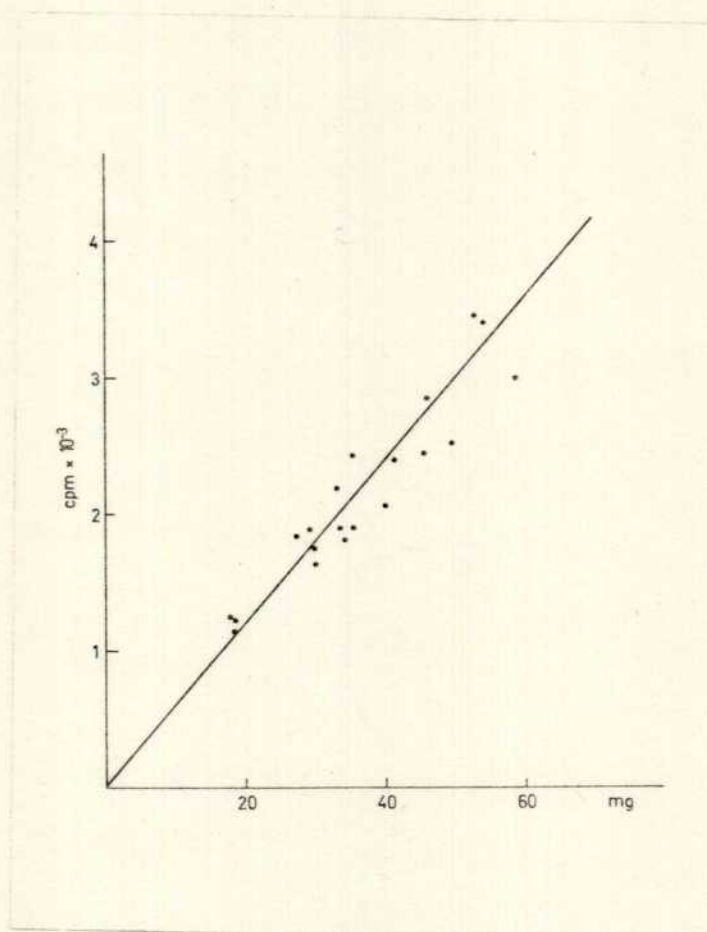
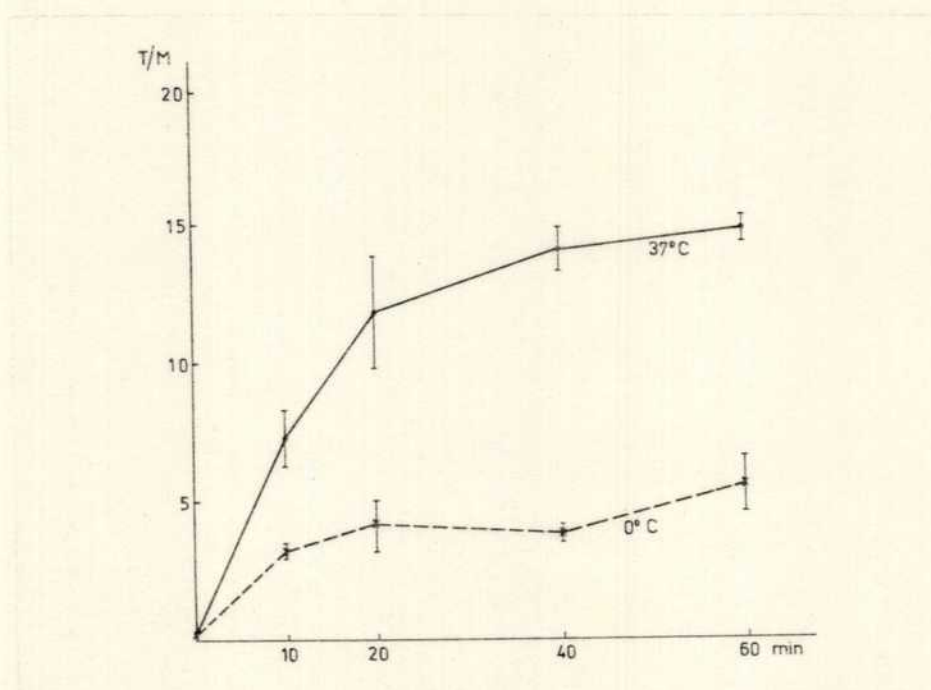


FIGURA 11

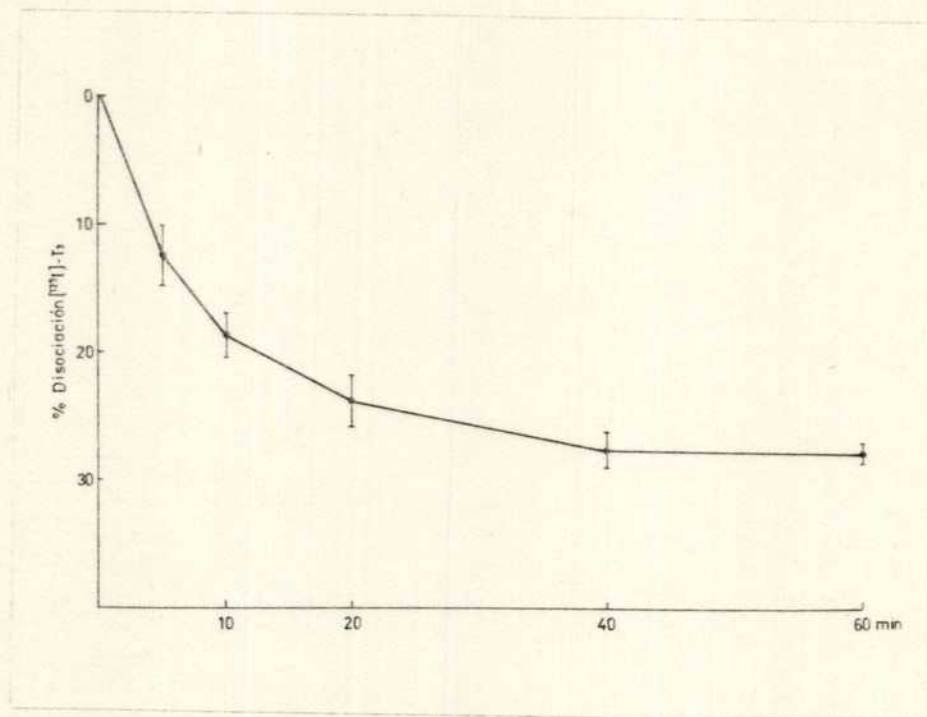
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA ENTRADA DE LA  
TRIYODOTIRONINA A LA TIROIDES.



Curva de tiempo de la captación de  $^{125}\text{I-T}_3$  por cortes de tiroides. Los mismos fueron incubados en KRB durante los tiempos que se indican, a las dos temperaturas, 37°C y 0°C. Cada valor es promedio de cuatro cortes de tejido  $\pm$  1 D.S.

FIGURA 12

LIBERACION DE  $T_3$  MARCADA DE CORTES DE TIROIDES



Los cortes fueron incubados con  $^{125}\text{I}-T_3$ , durante 60 minutos y luego se transfirieron a tubos individuales con buffer KRB. A los tiempos indicados se midió la radiactividad del medio de incubación. Los valores se expresan como % del promedio de radiactividad de un grupo de cortes a tiempo cero. Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tejido - 1 DS.

Iguals cantidades de L-T<sub>4</sub>, DIT, MIT y IK no alteraron la relación T/M como se aprecia en la tabla 5.

También se estudió la influencia de diversos inhibidores metabólicos, así como de AMPc y GMPc sobre la entrada de T<sub>3</sub> a la célula. En la tabla 5 se observa que la ouabaína produjo una leve y no significativa disminución del T/M, al igual que la puromicina y el dinitrofenol. En cambio la actinomicina D y la cicloheximida causaron un inesperado aumento de la relación T/M. Estos resultados se obtuvieron en diferentes experimentos y con dos concentraciones de actinomicina D: 10 µg/ml y 2 µg/ml.

Cuando los cortes de tiroides fueron preincubados con AMPc y GMPc, se obtuvo una marcada estimulación de la entrada de la hormona a la célula.

La ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio de incubación, disminuye levemente la entrada de la T<sub>3</sub> a la célula. (Tabla 6)

#### 1.6.- EFFECTO DEL pH SOBRE LA ENTRADA DE LA $\left[^{125}\text{I}\right]$ -T<sub>3</sub>:

En la tabla 7 se muestra el efecto del pH sobre la captación de la T<sub>3</sub> marcada por cortes de tiroides. El valor del pH óptimo es el del KRB de 7,6.



TABLA 5

INFLUENCIA DE DIVERSOS COMPUESTOS SOBRE LA  
ENTRADA DE T<sub>3</sub> A LA CELULA.

Tratamiento	Concentración	% Captac. T <sub>3</sub> <sup>*</sup>
Control		100
IK	10 <sup>-6</sup> M	92
L-tiroxina	10 <sup>-6</sup> M	112
MIT	10 <sup>-6</sup> M	91
DIT	10 <sup>-6</sup> M	84
Ouabaína	10 <sup>-3</sup> M	85
Actinomicina D	10 $\mu$ g/ml	160
	2 $\mu$ g/ml	167
Dinitrofenol	10 <sup>-3</sup> M	97
Cicloheximida	100 $\mu$ g/ml	138
Puromicina	100 $\mu$ g/ml	88
AMPc	10 <sup>-3</sup> M	158
GMPc	10 <sup>-3</sup> M	133

Cortes de tiroides fueron incubados por cuádruplicado con las distintas sustancias, durante 30 minutos. Se agregaba entonces una dosis trazadora de T<sub>3</sub> marcada y se continuaba la incubación durante 1 minuto. La relación T/M de los controles era de alrededor de 2. Similares resultados fueron obtenidos con pulsos más largos.

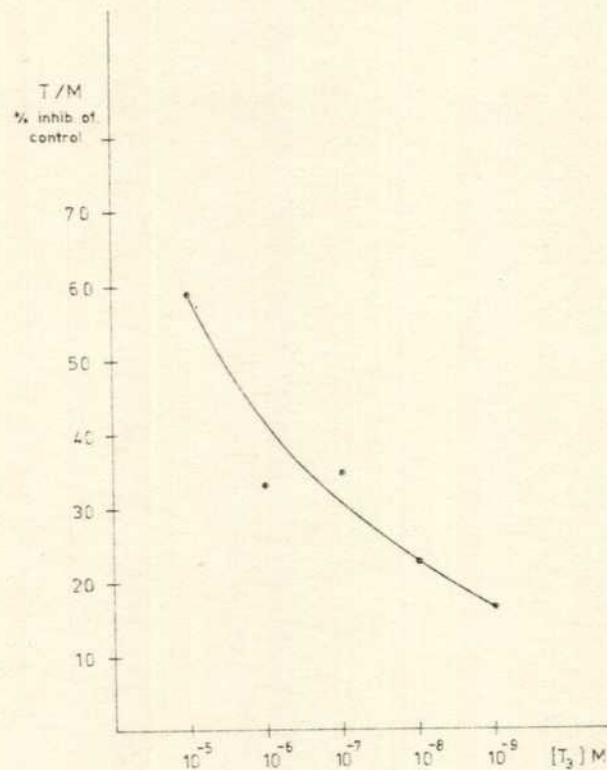


Fig. 13 - Acción de la  $T_3$  no marcada en la entrada de la  $^{125}\text{I}$ - $T_3$  a la célula tiroidea. Los cortes fueron incubados con la hormona no marcada durante 30 minutos. Luego se agregó una dosis trazadora de  $^{125}\text{I}$ - $T_3$  haciéndose un pulso de 1 minuto. Los valores son el promedio de 4 cortes y están expresados como % de los cortes incubados en ausencia de  $T_3$  no marcada, los que son tomados como 100%.

T A B L A 6

T/M		
Control	17,2	$\pm$ 2,1
KRB $\propto$ Ca <sup>2+</sup>	13,2	$\pm$ 2,5

Efecto de la ausencia de la Ca<sup>2+</sup> en el medio de incubación sobre la captación de la <sup>125</sup>I - T<sub>3</sub> por cortes de tiroides. Los resultados son promedios de cuatro cortes  $\pm$  D.S. p < 0,05.

T A B L A 8

	Fracción Subcelular		
	sobr.20000xg	ppdo.20000xg	900xg
Control	55,2 $\pm$ 3,0	17,0 $\pm$ 1,7	27,1 $\pm$ 1,9
T <sub>3</sub> 10 <sup>-5</sup> M	55,7 $\pm$ 1,7	17,1 $\pm$ 3,2	27,1 $\pm$ 5,2

Distribución subcelular de la T<sub>3</sub>. Cortes de tiroides fueron incubados por cuádruplicado con y sin T<sub>3</sub> 10<sup>-5</sup>M. Cada valor es el promedio de cuatro muestras  $\pm$  D.S.



T A B L A 7

EFFECTO DEL pH EN LA CAPTACION DE T<sub>3</sub> POR  
CORTES DE TIROIDES

pH	T/M
4,7	15,6 $\pm$ 1,4
5,6	16,5 $\pm$ 1,8
6,7	17,7 $\pm$ 1,3
7,6	19,5 $\pm$ 1,2
8,2	17,9 $\pm$ 1,4
9,4	15,0 $\pm$ 0,5

Los cortes de tiroides fueron incubados en buffer KRB con diferentes valores de pH obtenidos por agregado de OHNa ó HCl. Cada valor es el promedio de cuatro cortes de tejido  $\pm$  DS.



### 1.7.- DISTRIBUCION SUBCELULAR DE $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>:

La figura 14 muestra la distribución subcelular, luego de un pulso de 60 minutos. Como se puede observar, la mayor cantidad de la radiactividad fue localizada en la fracción correspondiente al sobrenadante de 20000 x g. Alrededor del 1% se encontró en los núcleos purificados. Cuando se comparó la distribución en cortes incubados con o sin L-T<sub>3</sub> 10<sup>-5</sup>M, la única fracción en la que se encontró un desplazamiento significativo de la T<sub>3</sub> marcada, fue la correspondiente a los núcleos purificados, no así en el precipitado de 900 x g de núcleos impuros. (Figura 14 y Tabla 8).

### 1.8.- PRESENCIA DE PRODUCTOS YODADOS EN NUCLEOS DE TIROIDES A PARTIR DE $^{125}\text{I}$ :

La Tabla 9 muestra la distribución del  $^{125}\text{I}$  en diferentes fracciones subcelulares, luego de 60 minutos. La mayor cantidad de radiactividad se encontró en la fracción soluble (alrededor de un 89%), mientras que en los núcleos el porcentaje varió de un 0,4% a un 1,4% en los diferentes experimentos realizados.

Cuando se efectuó la cromatografía de la fracción nuclear, se observó la presencia de diversos compuestos yodados. La cantidad de T<sub>3</sub> presente en los núcleos fue de un 3,5% a un 6,6% y la de T<sub>4</sub> varió de un 2,0% a un 4,0% en los diversos experimentos. La pancreatina no alteró estos últimos valores, pero sí los del origen, péptidos menores y DIT.

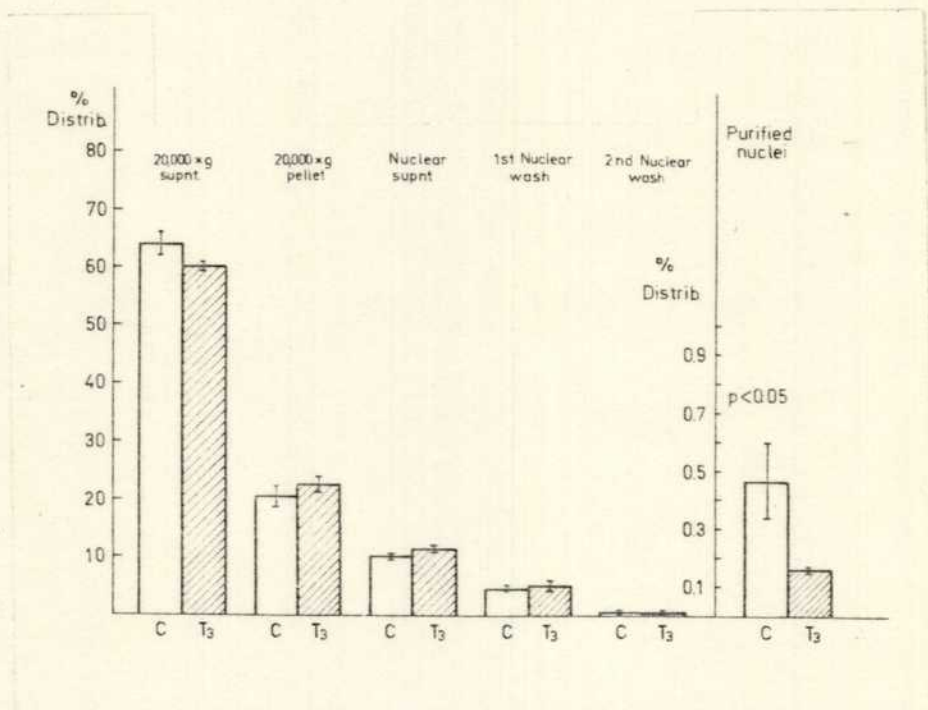


Figura 14

Cortes de tiroides fueron incubados por cuadruplicado con  $^{125}\text{I}$  T<sub>3</sub>, con (barra sombreada) y sin T<sub>3</sub> 10<sup>-5</sup>M. Se obtuvieron las fracciones subcelulares como se describió en materiales y métodos. Cada valor es el promedio de cuatro muestras  $\pm$  DS.

T A B L A 9

Fracción subcelular	Control 37°C 60'inc.	0°C 60'inc.	37°C 1' inc.
Sobr. 20000xg	88,36 ± 0,62	89,95 ± 0,14	96,54 ± 0,05
Ppdo. 20000xg	8,35 ± 0,42	5,76 ± 0,45	1,47 ± 0,01
Sobr.nucl. (Sac.2.1M)	1,92 ± 0,30	3,13 ± 0,36	1,86 ± 0,06
1 <sup>er</sup> lavado nuclear	0,93 ± 0,01	1,03 ± 0,06	0,12 ± 0,007
2 <sup>do</sup> lavado nuclear	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00
núcleos purificados.	0,36 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,00

Distribución subcelular del  $^{125}\text{I}$  en cortes de tejidos de tiroides.

Las incubaciones se realizaron tal cual se describió en materiales y métodos. Cada valor es el promedio de las tres muestras: ± D.S.

T A B L A 10

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE COMPUESTOS YODADOS  
EN NUCLEOS TIROIDEOS

<u>Compuesto</u>	<u>Tratamiento</u>	
	<u>Sin pancreatina</u>	<u>Con pancreatina</u>
origen	34,3 $\pm$ 5,6	7,6 $\pm$ 2,1
DIT	7,3 $\pm$ 1,9	38,0 $\pm$ 6,9
I <sup>-</sup>	31,8 $\pm$ 8,8	30,7 $\pm$ 5,2
MIT	1,5 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,5
T <sub>4</sub>	3,0 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 1,3
T <sub>3</sub>	5,8 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 3,0
frente solvente	16,3 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 5,7

Luego de la obtención de la fracción nuclear purificada, se la cromatografió con o sin tratamiento con pancreatina tal cual se describe en métodos. Los resultados son promedios de cua driplicados  $\pm$  D.S.

Se observó también un 10-16% de radiactividad en el frente del solvente, correspondiente a compuestos yodados de naturaleza lipídica. Los resultados se observan en la Tabla 10.

La posible contaminación de la fracción nuclear por parte del homogenato, fue analizada mediante diferentes diseños experimentales. Cuando la incubación se realizó a 0°C el porcentaje presente en la fracción nuclear fue del 0,065%. Cuando se agregó el  $^{125}\text{I}$  inmediatamente antes de la homogeneización, el porcentaje de radiactividad correspondientes a los núcleos, fue del 0,02%, al igual que cuando se reconstituyó el precipitado nuclear de cortes incubados sin radiactivo con homogenato marcado con  $^{125}\text{I}$ . (Tabla 9).

En la Tabla 11, observamos el porcentaje respecto al control (incubación a 37°C) de la radiactividad total presente en el tejido y de la correspondiente a la fracción nuclear, para las diferentes condiciones de incubación. Se puede observar que la radiactividad total disminuye a un 21,5%, incubando a 0°C y a un 10,3% cuando se agrega al  $^{125}\text{I}$  antes de la homogeneización. En lo que respecta a los núcleos, la disminución es más pronunciada. El valor es de un 4% para la incubación a 0°C y de 0,6% cuando el trazador se agrega antes de la homogeneización. Estos resultados descartarían una posible contaminación nuclear en los estudios de distribución subcelular.



T A B L A 11

CONTROL DE CONTAMINACION NUCLEAR

Grupo	Temp. °C	t.inc. min.	cpm.tej.total	cpm.núcleos	% radiact.en núcleos	rad.en tej. % del cont.	rad.en nú- cleos % del cont.
A	37	60	81942900	278500	0,34	100	100
B	4	60	17588850	11130	0,06	21,5	4
C	37	1	8426925	1734	0,02	10,3	0,6

2 ó 3 gramos de cortes de tiroides se incubaron por triplicado durante los tiempos indicados con <sup>125</sup>I, tal cual se describe en 2.8. Los valores del grupo A se tomaron como controles para los otros grupos.

1.9.- UNION DE LA  $[^{125}\text{I}]$ - $\text{T}_3$  A NUCLEOS PURIFICADOS:

Dado que se observó desplazamiento de la  $^{125}\text{I}$ - $\text{T}_3$  por parte de la  $\text{T}_3$  no marcada en la fracción celular, se decidió estudiar la unión de la  $\text{T}_3$  a núcleos aislados. La figura 15 muestra la unión específica de la  $\text{T}_3$  marcada a núcleos purificados a diferentes tiempos de incubación. Se observa una meseta a los 90 minutos de incubación. La unión de la hormona es lineal con cantidades crecientes de núcleos, como se observa en la figura 16.

La temperatura óptima de incubación fue de 20°C. Incubando a 0°C y 40°C se obtuvieron valores inferiores de unión, respecto a los de 20°C. (63 y 66% respectivamente). (Tabla 12)

1.10.- EFFECTOS DE LAS ENZIMAS EN LA UNION DE  $[^{125}\text{I}]$ - $\text{T}_3$  A NUCLEOS AISLADOS DE GLANDULA TIROIDES:

En la Tabla 13 se observa el efecto de diversas enzimas sobre la unión de la  $\text{T}_3$  marcada a los núcleos tiroideos. Las enzimas proteolíticas proteasa y tripsina abolieron totalmente la unión de la hormona al receptor. La DNasa disminuyó la unión a un 62%, mientras que la RNasa, no tuvo efecto alguno.

1.11.- CARACTERIZACION DE LOS SITIOS DE UNION NUCLEARES PARA TRIYODOTIRONINA EN GLANDULA TIROIDES BOVINA:

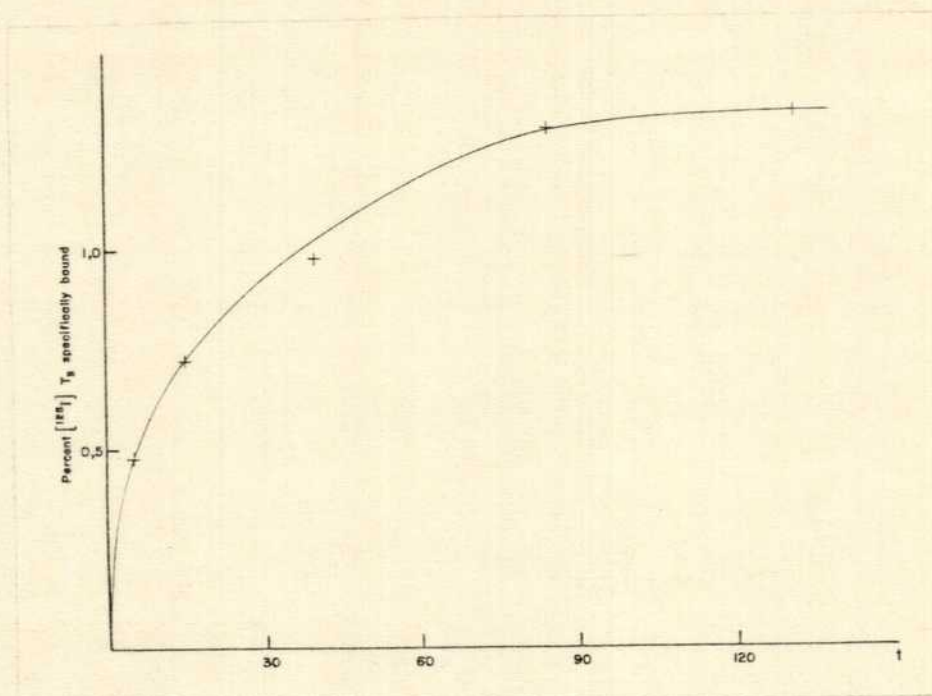


Figura 15

Unión de  $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$  a núcleos purificados de tiroides en función del tiempo de incubación. Cada valor es el promedio de cuádruplicados. La cantidad de ADN en cada tubo fue de 100  $\mu$ g aproximadamente.



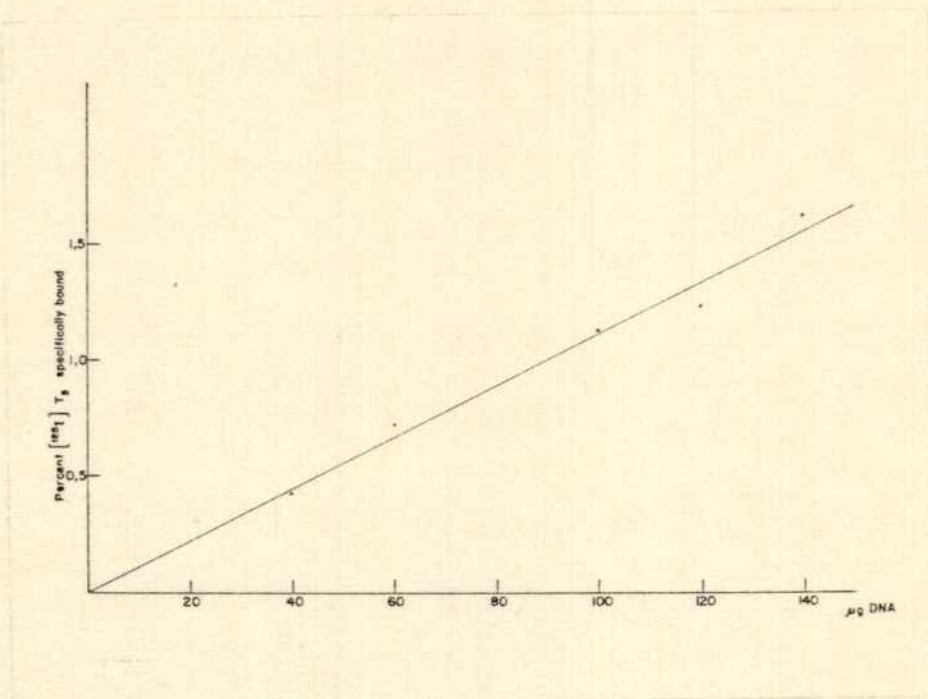


Figura 16

Unión específica de  $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$  a cantidades crecientes de núcleos ( $\mu\text{g ADN}$ ). Las incubaciones se realizaron durante 120 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . Cada valor es el promedio de cuádruplicados.

T A B L A    12

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LA  
UNION DE LA  $^{125}\text{I}$   $\text{T}_3$  A NUCLEOS TIROIDEOS

Temperatura	$\left[^{125}\text{I}\right]\text{T}_3$ unida (% del control)
Control (20°C)	100
0°C	63
40°C	66

Núcleos tiroideos (100 g ADN) se incubaron por cuádruplicado, durante 120 minutos, tal como se describe en materiales y métodos, a las temperaturas indicadas en la tabla.

T A B L A 13

EFFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMATICO SOBRE  
LA UNION DE  $^{125}\text{I}$   $\text{T}_3$  A NUCLEOS TIROIDEOS

Enzima	$^{125}\text{I}$ $\text{T}_3$ unida (% control)
control	100
Proteasa (100 $\mu$ g/ml)	0
Tripsina (100 $\mu$ g/ml)	0
RNasa ( 50 $\mu$ g/ml)	95
DNasa (50 $\mu$ g/ml)	62

Los núcleos (100  $\mu$  g ADN) se incubaron por cuádruplicado, tal cual se describió en materiales y métodos.

Se estudiaron las propiedades de los sitios de unión nucleares. En la figura 17 se observa el desplazamiento de la hormona marcada de su unión al núcleo por cantidades crecientes de hormona fría. De esta curva, corrigiendo por las diferentes actividades específicas, se obtuvieron las cantidades totales de hormona unida. (Figura 17). Con estos datos se calculó la constante de afinidad y la capacidad de unión. El análisis de estos datos, según el método de Scatchard, reveló la presencia de dos clases de sitios de unión: una con una  $K_a$  de  $2,5 \times 10^8 M^{-1}$  y una capacidad de  $0,43 \times 10^{-15}$  moles/ $\mu$ g ADN y la otra con una  $K_a$  de  $4,9 \times 10^6 M^{-1}$  y una capacidad de  $15,08 \times 10^{-15}$  moles/ $\mu$ g ADN. (Figura 18)

#### 1.12.- SOLUBILIZACION PARCIAL DEL RECEPTOR:

Cuando se realizó la extracción de los núcleos incubados con  $^{125}I - T_3$ , se observó que las mejores condiciones de extracción eran en las que se utilizaba una solución de KCl 0,4M;  $MgCl_2$  3mM, EDTA 2mM, mercaptoetanol 5mM, glicerol 10% en Tris-HCl 20mM pH 7,8, durante 60 minutos a 0°C (Tabla 14). Si bien la extracción bajo estas condiciones fue la menor (69%), se obtuvo un mayor rendimiento de  $^{125}I - T_3$  unida.

Cuando se sembró este extracto en una columna de Sephadex G-25, se observó que parte de la  $[^{125}I] T_3$  estaba asociada a una molécula de alto peso molecular, excluida totalmente de la columna. Este pico de radiactividad coincidió con el obtenido por espectrofotometría



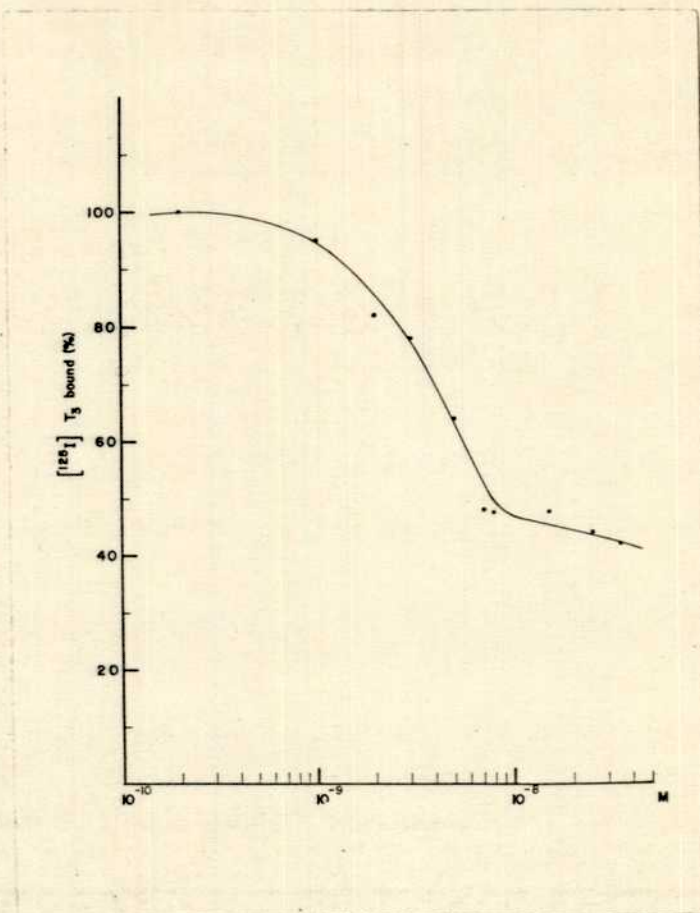


Fig. 17- Desplazamiento de la unión a núcleos de tiroides de la  $[^{125}\text{I}] \text{T}_3$  por el agregado de L-T<sub>3</sub> no marcada. Cada punto es el promedio de 3 determinaciones.

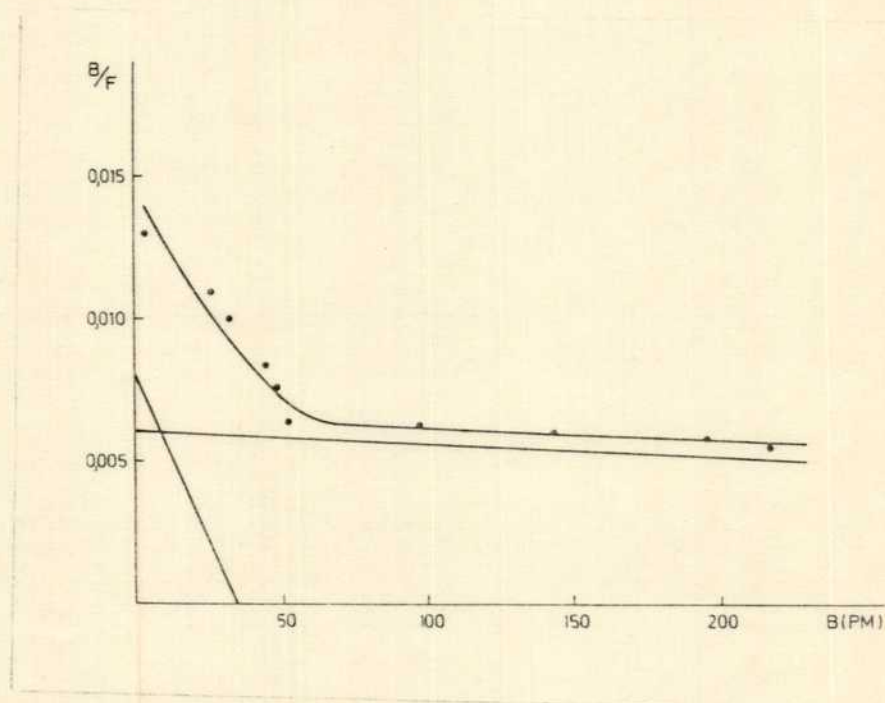


Fig. 18- Gráfico de Scatchard de la unión de  $\left[^{125}\text{I}\right] \text{T}_3$  a núcleos de tiroides. Los datos se obtuvieron a partir de la curva de desplazamiento de la unión de  $^{125}\text{I} \text{T}_3$  por  $\text{T}_3$  no marcada. (Fig. 17 ) Cada punto es el promedio de 3 determinaciones. La cantidad de núcleos correspondió a  $80 \mu \text{g}$  de ADN.



T A B L A 14

Buffer de extracción	T (°C)	% Rad. extraída	t (min)	% unión
KMT	20	70,8	20	4,0
"	20	73,9	45	3,5
"	20	76,1	90	3,8
"	37	71,8	45	2,5
"	0	78,7	45	4,7
KMT + glicerol 10%	20	72,1	45	3,7
KMT + glicerol 10% + EDTA 2mM	20	71,4	45	3,7
"	0	69,9	45	4,1
"	0	69,5	60	6,1

La extracción fue realizada tal cual se describe en materiales y métodos. KMT = KCl 0,4 M; Mg Cl<sub>2</sub> 3 mM; mercaptoetanol 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,8.

de cada una de las fracciones a 280 nM. En el caso de los núcleos incubados en presencia de  $T_3$   $10^{-6}M$  el pico de radiactividad correspondiente a la  $T_3$  unida a la macromolécula, fue menor que aquel obtenido cuando se incubó únicamente con hormona radiactiva. (Fig. 19)

## 2.1.- EFFECTOS DE LA GANGLIECTOMIA CRONICA SOBRE LA FUNCION TIROIDEA.

### 2.1.1. Efectos de la Gx bilateral sobre la respuesta bociógena al MMI:

Siete días después de la Gx bilateral u operación simulada, los animales fueron tratados con MMI por otros 4 días. Se registró el peso de la glándula tiroides y los niveles de TSH en cada grupo (tabla 15). En los animales inyectados con salina, la desnervación no modificó ninguno de los parámetros estudiados. En cambio, en los animales tratados con MMI se observó un aumento de peso que fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) en el grupo Gx que en el sometido a operación simulada, como lo reveló el análisis factorial de los datos (Interacción "Gx x MMI") seguido por test de  $t$  modificado. La respuesta del TSH sérico a la administración de MMI no mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. (Tabla 15)

Cuando el tratamiento con MMI se comenzó 3 días después de la desnervación bilateral, se observó una tendencia no significativa al presentar un mayor aumento de peso tiroideo en el grupo Gx que en el grupo control. (Tabla 16)



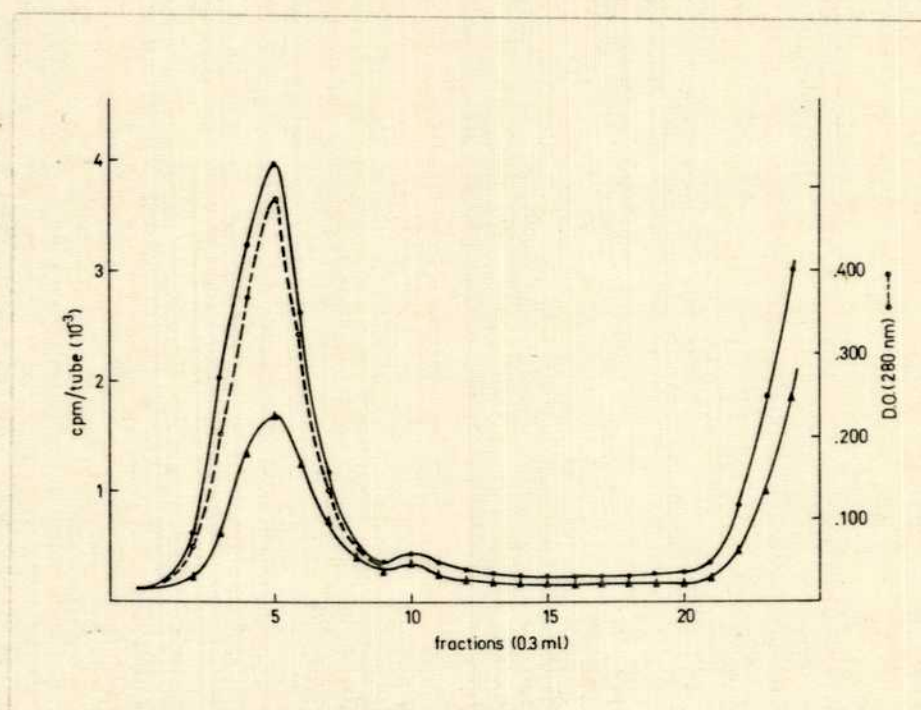


Figura 19

Cromatografía en columna de Sephadex G25 de extractos de núcleos incubados con  $^{125}\text{I}$   $[\text{T}_3]$  (●—●) sin agregado de  $\text{L-T}_3$ ; (▲—▲) con agregado de  $10^{-6}\text{M T}_3$ .

TABLA 15 : RESPUESTA BOCIÓGENA AL METILMERCAPTOIMIDAZOL (MMI) EN RATAS  
SOMETIDAS A GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (Gx) BILATERAL  
7 DIAS ANTES.<sup>a</sup>

Grupo	Tratamiento	n	Peso tiroideo (mg/100g peso corp.)	TSH sérico (ng/ml)
Gx	salina	7	5.78 ± 0.28	501 ± 29
	MMI	8	10.07 ± 0.49	1317 ± 108
Operación simulada	salina	8	5.69 ± 0.20	492 ± 31
	MMI	8	7.88 ± 0.30 <sup>b</sup>	1124 ± 106

<sup>a</sup>Las ratas se sometieron a Gx u operación simulada y 7 días después se inyectaron con MMI (4 mg/día) durante 4 días. Los resultados se expresan como Media ± ES. El análisis estadístico se realizó por análisis factorial y test de  $t$  modificado<sup>39</sup>.

<sup>b</sup>Significativamente diferente de las ratas Gx inyectadas con MMI. ( $p < 0.01$ )



TABLA 16 : RESPUESTA BOCIÓGENA AL METILMERCAPTOIMIDAZOL (MMI) EN RATAS  
SOMETIDAS A GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (Gx) BILATERAL  
3 DÍAS ANTES<sup>a</sup>.

Grupo	Tratamiento	n	Peso tiroideo (mg/100g peso corp.)
Gx	salina	6	4.80 ± 0.37
	MMI	6	8.02 ± 0.63 <sup>b</sup>
Operación simulada	salina	8	5.69 ± 0.20
	MMI	8	7.88 ± 0.30 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Las ratas se sometieron a Gx u operación simulada y 3 días después se inyectaron con MMI (4 mg/día) durante 4 días. Los resultados se expresan como Media ± ES. El análisis estadístico se realizó como en Tabla 15.

<sup>b</sup> Significativamente diferente de las ratas inyectadas con salina ( $p < 0.01$ )

2.1.2.- EFFECTOS DE LA PINEALECTOMIA SOBRE LA RESPUESTA  
BOCIOGENA AL MMI:

Para estudiar este efecto, ratas sometidas a pinealectomía u operación simulada 7 días antes, fueron tratadas con MMI durante 4 días. Se registró el peso de la glándula tiroides y se midieron los niveles de TSH sérico. Como puede observarse en la tabla 17, la pinealectomía no modificó ninguno de los parámetros estudiados en los animales inyectados con salina, ni afectó la respuesta al tratamiento con MMI.

2.1.3.- EFFECTOS DE LA Gx BILATERAL SOBRE LA RESPUESTA  
BOCIOGENA AL TSH:

Se inyectaron 100 mU de TSH/día durante 4 días a ratas desnervadas o sometidas a operación simulada 7 días antes. Como puede verse en la figura 20 se verificó un mayor aumento de peso en el grupo Gx (78%) que en el control (35%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ). Es decir, las ratas desnervadas fueron más sensibles que sus testigos a la administración de TSH.

2.1.4.- EFFECTOS DE LA Gx BILATERAL SOBRE LA SINTESIS EN  
TIROIDES DE ARN:

Como se mencionó anteriormente, la desnervación no modificó el peso de la tiroides en los animales sacrificados al 7° día de la operación (tabla 15).

TABLA 17 : RESPUESTA ROCIOGENA AL METLMERCAPTOIMIDAZOL (MMI) EN RATAS  
SOMETIDAS A PINEALECTOMIA 7 DIAS ANTES<sup>a</sup>.

Grupo	Tratamiento	n	Peso tiroideo (mg/100g peso corp.)	TSH sérico (ng/nl)
Pinealectomía	salina	6	7.73 ± 0.28	625 ± 73.4
	MMI	6	9.67 ± 0.27	1475 ± 155.9
Operación simulada	salina	7	6.89 ± 0.26	685 ± 34.8
	MMI	6	9.49 ± 0.48	1775 ± 238

<sup>a</sup> Las ratas se sometieron a pinealectomía u operación simulada y 7 días después se inyectaron con MMI (4 mg/día) durante 4 días. Los resultados se expresan como Media ± ES. El análisis estadístico se realizó como en Tabla 1, no detectándose interacción significativa "cirugía x MMI".



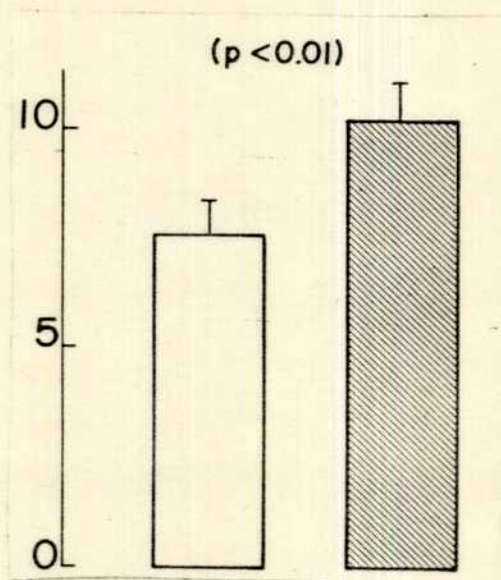


Fig. 20 : Respuesta bociógena al tratamiento con TSH 100mU/día, 4 días, en ratas gangliectomizadas (barra sombreada) o con operación simulada (barra blanca).  
En ordenadas: peso tiroideo (mg/100g de peso corporal).

Sin embargo, en ese momento se verificó un significativo incremento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina al ARN tiroideo (tabla 18). En otro grupo de ratas Gx bilateralmente, se hizo aparente un bocio espontáneo 4 semanas luego de la operación ( $Gx: 8.07 \pm 0.60$ ; operación simulada  $5.28 \pm 0.44$  mg/100g peso corporal,  $p < 0.01$ ).

2.1.5.- EFECTOS DE LA Gx BILATERAL SOBRE LA CAPTACION  
DE  $^{86}\text{Rb}$  POR LAS GLANDULAS TIROIDES Y PINEAL:

Para estimar el flujo sanguíneo en la tiroides y pineal, se midió la captación  $^{86}\text{Rb}$  a los 7 días de la cirugía. En los animales desnervados se observó una disminución significativa en la relación "radioactividad tejido/radioactividad sangre", tanto en la tiroides como en la pineal (figura 21), indicando una disminución del flujo en ambos órganos estudiados.

2.1.6.- EFECTOS DE LA Gx BILATERAL SOBRE EL CONTENIDO  
ENDOGENO DE NOREPINEFRINA, EPINEFRINA Y DOPAMINA  
DE LA GLANDULA TIROIDES:

Siete días después de la desnervación se observó una disminución significativa en los niveles endógenos de norepinefrina (81%) y epinefrina (68%), sin cambios en los niveles de dopamina (figura 22). Esta disminución en los valores de norepinefrina y epinefrina se verificó también en los animales 1 y 3 días después de la Gx (tabla 19). En cambio, 24 horas después de la desnervación o de

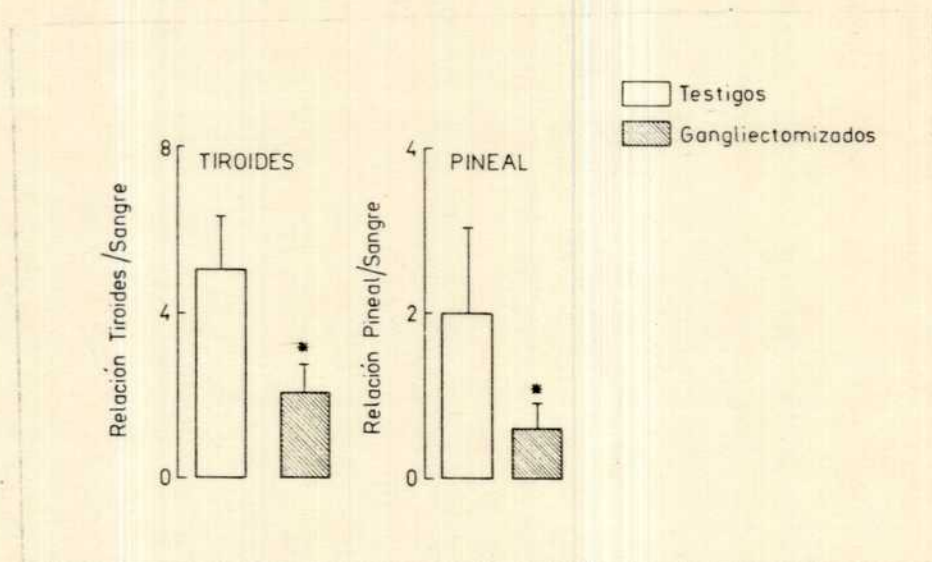


Fig. 21- Efecto de la gangliectomía cervical superior (Gx) sobre la captación de  $^{86}\text{Rb}$  por las glándulas tiroides y pineal. Los animales fueron sometidos a la cirugía 7 días antes.  
(\*)  $p < 0.05$ , test de  $t$ .



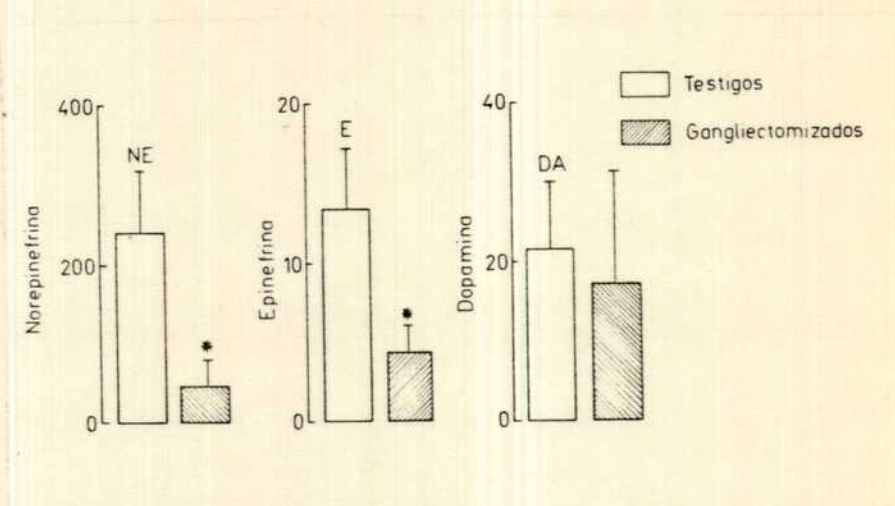


Fig. 22- Efecto de la gangliectomía cervical superior sobre los niveles tiroideos de norepinefrina (NE), epinefrina (E) y dopamina (DA). Los animales fueron sometidos a cirugía 7 días antes. (\*)  $p < 0.01$ , test de  $t$ .

TABLA 18: EFECTO DE LA GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (Gx) SOBRE LA INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -URIDINA A ARN TIROIDEO<sup>a</sup>

Grupo	n	Síntesis de ARN (dpm/ug ARN)
Gx	7	16.0 $\pm$ 1.6
Operación simulada	6	9.7 $\pm$ 1.1

<sup>a</sup> Las ratas fueron sometidas a Gx u operación simulada 7 días antes. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  .ES. La diferencia entre ambos grupos es significativa ( $p < 0.01$ , test de t).

la operación simulada, los niveles de dopamina se encontraron significativamente aumentados en ambos grupos. Dichos niveles fueron descendiendo a los 3 días y retornaron a los valores basales a los 7 días (tabla 19).

2.1.7.- EFFECTOS DE LA Gx BILATERAL EN LOS  $\alpha$  Y  $\beta$ -ADRENO-RECEPTORES TIROIDEOS:

El efecto de la desnervación sobre los  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenoreceptores tiroideos 7 días después de la Gx, se muestra en la figura 23. Los estudios de unión específica indicaron que en las membranas tiroideas de los animales desnervados y en los sometidos a operación simulada, los sitios de unión específica para  $^3\text{H-DHE}$  y  $^3\text{H-DHA}$  fueron saturables (figura 23). El análisis de Scatchard de las curvas de saturación indicaron que existe aparentemente una sola población de sitios de unión con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 20.9 nM ( $^3\text{H-DHE}$ ) y 10.2 nM ( $^3\text{H-DHA}$ ). Después de la desnervación los valores de  $K_d$  para los  $\alpha$ -adrenoreceptores, prácticamente no se modificaron. Sin embargo, el número máximo de sitios de unión aumentó significativamente en un 21% ( $p < 0.05$ , análisis de covarianza) (figura 23). No se observaron cambios en la afinidad o número de sitios de unión de los  $\beta$ -adrenoreceptores tiroideos por efecto de la gangliectomía.

Tabla 19 : NIVELES TIROIDEOS DE NOREPINEFRINA, EPINEFRINA Y DOPAMINA EN RATAS SOMETIDAS A GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (Gx) U OPERACION SIMULADA 1-7 DIAS ANTES <sup>a</sup>.

Tiempo transcurrido desde la cirugía	Grupo	Norepinefrina	Epinefrina	Dopamina
24 h	Gx	9.0 ± 2.8 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	141.3 ± 68.3
	Op.simulada	213.5 ± 21.0	3.7 ± 0.6	162.2 ± 58.5
3 días	Gx	17.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	51.2 ± 7.8
	Op.simulada	217.4 ± 19.9	5.1 ± 0.7	86.4 ± 13.7
7 días	Gx	17.9 ± 4.6 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	20.0 ± 7.5
	Op.simulada	228.6 ± 13.0	4.2 ± 0.3	29.8 ± 4.8

<sup>a</sup> Los resultados se expresan en pg/mg de tejido. Media ± ES, n=6 en cada grupo.

<sup>b</sup> p < 0.01 en relación a su respectivo testigo, test de t.



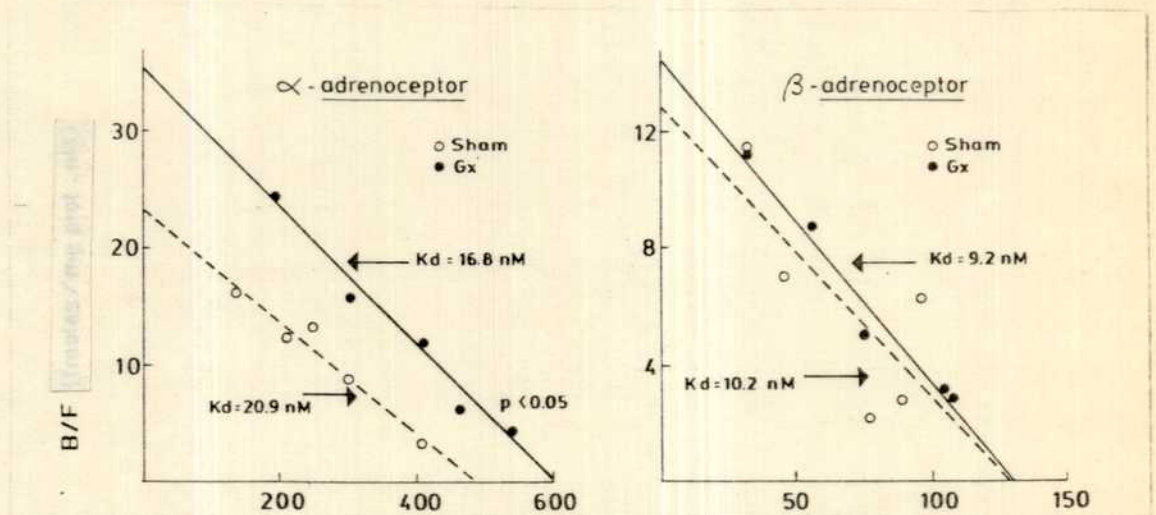


Fig. 23 : Determinación de  $\alpha$  y  $\beta$  adrenoreceptores en mebranas tiroideas (fracción  $P_2$ ). Los resultados se expresan como gráficos de Scatchard. Cada punto representa la media de triplicados. La pendiente e intercepción se calcularon por regresión lineal. El número de sitios de unión en el caso de los  $\alpha$ -adrenoreceptores difiere significativamente entre los animales gangliectomizados (Gx) y testigos ( $p < 0.05$ , análisis de covarianza). En abcisas, cantidad de radioligando unido específicamente. (f moles/mg de prot.)

2.1.8.- NIVELES DE NOREPINEFRINA Y EPINEFRINA EN AMBAS  
HEMITIROIDES LUEGO DE LA Gx UNILATERAL DERECHA:

Con el objeto de determinar el grado de bilateralidad en la inervación simpática tiroidea, se estudió la concentración de norepinefrina y epinefrina en los lóbulos tiroideos 12 días después de la Gx unilateral derecha. La remoción del GCS derecho produjo una disminución del 80% en el contenido de norepinefrina y un 30% en el contenido de epinefrina del lóbulo tiroideo ipsilateral (tabla 20).

2.1.9.- BOCIO ESPONTANEO E INDUCIDO POR MMI EN RATAS  
SOMETIDAS A Gx UNILATERAL:

Dado que la inervación simpática tiroidea es estrictamente ipsilateral, se resolvió estudiar el efecto de la ablación del GCS derecho sobre la respuesta bociógena al MMI. Para ello se inyectó MMI (4 mg) durante 11 días a partir del 4° día post-Gx unilateral derecha. Como puede observarse en la tabla 21, tanto en los animales que recibieron MMI como en los controles, el lóbulo derecho fue significativamente mayor que el izquierdo.

El bocio hemitiroideo derecho que se produce espontáneamente, luego de Gx ipsilateral, fue también observado a los 40 días de la cirugía (lóbulo derecho:  $5.17 \pm 0.26$ ; lóbulo izquierdo:  $4.01 \pm 0.25$  mg/100g. peso corporal  $p < 0.01$ ). (Test de  $\bar{t}$  para muestras apareadas).

TABLA 20

CONTENIDO TIROIDEO DE NOREPINEFRINA Y EPINEFRINA EN RATAS  
SOMETIDAS A GANGLIECTOMIA UNILATERAL DERECHA.

	<u>Contenido en catecolamina (pg/mg tejido)</u>	
	<u>Lóbulo izquierdo</u>	<u>Lóbulo derecho</u>
Norepinefrina	609,7 ± 55,5 <sup>a</sup>	123,5 ± 30,3
Epinefrina	11,6 ± 1,4 <sup>b</sup>	8,1 ± 1,2

Las ratas fueron sometidas a Gx unilateral, 12 días antes del sacrificio. Los resultados se expresan como Media ± ES.

a  $p < 0,001$  (test de t para muestras apareadas).

b  $p < 0,05$  (test de t para muestras apareadas).



TABLA 21 : RESPUESTA BOCIOGENA AL METILMERCAPTOIMIDAZOL EN RATAS SOMETIDAS  
A Gx GANGLIECTOMIA ULILATERAL DERECHA 4 DIAS ANTES <sup>a</sup>.

Tratamiento	n	Lóbulo derecho (mg/100g peso corp.)	Lóbulo izquierdo (mg/100g peso corp.)
vehículo	7	3.15 ± 0.26	2.35 ± 0.17
MMI 11 días	8	6.58 ± 0.48	5.34 ± 0.49

Las diferencias entre el lóbulo derecho y el izquierdo son significativas en ambos grupos experimentales (test de t para muestras apareadas) ( $p < 0.02$ )



2.1.10.- CONTENIDO DE  $T_3$  Y DE  $T_4$  EN LOBULOS TIROIDEOS  
LUEGO DE LA Gx UNILATERAL DERECHA:

En la tabla 22 se muestra el contenido de hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ) en los lóbulos tiroideos de ratas sometidas a Gx unilateral derecha. El estudio se realizó 30 días post-Gx y se observó que el contenido de  $T_3$  y  $T_4$  está disminuido en el lóbulo denervado.

2.1.11.- METABOLISMO DE  $^{125}I$  EN LOBULOS TIROIDEOS LUEGO  
DE LA Gx UNILATERAL DERECHA:

Se estudió el metabolismo del  $^{125}I$  en lóbulos tiroideos de ratas sacrificadas 30 días post-Gx unilateral derecha. Como puede observarse en la tabla 23, se obtuvieron diferencias en los porcentajes de DIT y MIT. La relación MIT/DIT es mayor en el lóbulo izquierdo ( $0.36 \pm 0.04$ ) que en el derecho ( $0.73 \pm 0.11$ ).

2.2.- EFFECTOS DE LA GANGLIECTOMIA AGUDA SOBRE LA FUNCION  
TIROIDEA:

2.2.1.- Efecto de la Gx aguda sobre el contenido tiroideo  
de norepinefrina:

Se ha demostrado que cuando los terminales nerviosos se desintegran durante el proceso degenerativo que sigue a la Gx, el neurotransmisor contenido en las variaciones neurales es liberado y actúa sobre los receptores

TABLA 22

EFFECTO DE LA GANGLIECTOMIA UNILATERAL DERECHA SOBRE EL  
CONTENIDO TIROIDEO DE TRIYODOTIRONINA ( $T_3$ ) Y TIROXINA ( $T_4$ )

	<u>Lóbulo izquierdo</u>	<u>Lóbulo derecho</u>
Triyodotironina ( $T_3$ ) (ng/mg tejido)	10,7 $\pm$ 0,6 (21) <sup>a</sup>	9,2 $\pm$ 0,5 (21)
Tiroxina ( $T_4$ ) (ng/mg tejido)	178,2 $\pm$ 18,9 (21) <sup>a</sup>	137,3 $\pm$ 12,2 (21)
Peso tiroideo (mg/100g peso corporal)	2,26 <sup>+</sup> 0,18 (7) <sup>a</sup>	2,88 <sup>+</sup> 0,13 (7)

La gangliectomía unilateral fue realizada 30 días antes del sacrificio.  
Los resultados se expresan como Media  $\pm$  ES. (n)

a  $p < 0,01$  (test de t para muestras apareadas)

METABOLISMO DEL  $^{125}\text{I}$  EN TIROIDES DE RATA SOMETIDAS A

## GANGLIECTOMIA UNILATERAL DERECHA

	<u>Lóbulo izquierdo</u>	<u>Lóbulo derecho</u>
monoyodotirosina (MIT)	26,3 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	16,1 $\pm$ 0,8
diyodotirosina (DIT)	36,0 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	45,0 $\pm$ 1,7
triyodotironina ( $T_3$ )	4,3 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,2
tiroxina ( $T_4$ )	17,9 $\pm$ 1,3	13,5 $\pm$ 1,1
I <sup>-</sup>	7,3 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,2
Relación MIT/DIT	0,73 <sup>+</sup> 0,11 <sup>a</sup>	0,36 <sup>+</sup> 0,04

A los 30 días post Gx unilateral se inyectaron 8 ratas con  $10\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$  i.p.

24 horas antes del sacrificio. Se analizaron los diferentes yodocompuestos formados tal como se describe en materiales y métodos. La captación de  $^{125}\text{I}$  (cpm/mg de tejido) fue la misma en ambos lóbulos (derecho: 77975<sup>+</sup>11312; izquierdo: 73758<sup>+</sup>11124). Los resultados se expresan como Media  $\pm$  ES. a:p < 0,05 (test para muestras apareadas)

postsimpáticos. Esta "actividad de degeneración" ha sido detectada en órganos como la glándula submaxilar y parótida, la membrana nictitante y los músculos retractores del párpado y reproduce la actividad del nervio normal durante su estimulación. (Almgren y col., 1976; Emmelin y Trendelenburg, 1972; Haggendal, 1980). El objetivo de los estudios que se presentan a continuación fue examinar los cambios en el eje hipofisotiroideo durante el proceso de degeneración de los terminales nerviosos simpáticos luego de la Gx bilateral en ratas.

La figura 24 muestra las variaciones en el contenido de norepinefrina en la tiroides, 3 a 24 horas post-Gx. La operación determinó una declinación abrupta de la catecolamina en el período comprendido entre las 8-16 horas posteriores. Luego de las 16 horas, la concentración de norepinefrina tiroidea fue de alrededor del 5-10% la de animales con operación simulada, lo que confirma los hallazgos previos a 24 horas, 3 ó 7 días post Gx (figura 22 y tabla 19). Dado que datos previos en el territorio del GSC indicaban que la liberación del neurotransmisor de terminales nerviosas aisladas, luego de la Gx (estimada por la disminución de transmisor) dura 8-10 horas hasta que la degeneración de las varicosidades se completa (Almgren y col., 1976; Emmelin y Trendelenburg, 1972; Haggendal, 1980), las ratas se sacrificaron 14 horas post-cirugía para examinar los cambios en la función tiroidea durante este fenómeno.



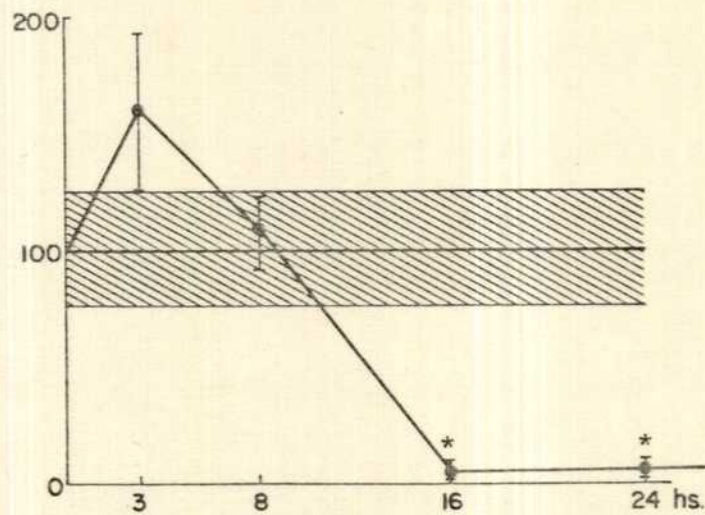


Fig. 24- Cambios porcentuales en el contenido de norepinefrina de la glándula tiroides 3-24h luego de la gangliectomía cervical bilateral (Gx). Valor promedio control en los animales con operación simulada:  $396 \pm 76$  pg/mg tiroides (SD) (\*)  $p < 0.001$  en relación al control, test de  $t$ .

### 2.2.2.- EFFECTO DE LA Gx AGUDA SOBRE EL EJE HIPOFISO-TIROIDEO:

La tabla 24 muestra los valores de diferentes parámetros (captación de  $^{131}\text{I}$ ,  $T_4$  total y libre,  $T_3$  y TSH séricas) de ratas Gx y con operación simulada (14 horas post-cirugía) inyectadas con TSH (250 mU ip, 60 minutos antes del sacrificio) o con vehículo. Cuando los datos se analizan como "efecto principal" por un análisis factorial de varianza, se pudo determinar un efecto significativo de la Gx en la depresión de la captación tiroidea de  $^{131}\text{I}$ ,  $T_4$  total y libre ( $p < 0.01$ ). La Gx también disminuyó significativamente la TSH sérica (45%) en los animales tratados con vehículo ( $p < 0.05$ ). La administración de TSH bovina produjo un aumento significativo de la  $T_4$  total y libre, así como de la  $T_3$  en los animales con operación simulada. En los Gx sólo aumentó la  $T_3$ .

El efecto depresivo de la Gx sobre la captación fue más marcado cuando el  $^{131}\text{I}$  fue inyectado simultáneamente con la TSH. Tanto en las ratas Gx como en las de operación simulada, la administración de TSH aumentó la TSH circulante en forma similar.

Es de destacar que en experimentos adicionales se obtuvieron datos que apoyan la idea de que los cambios observados en el eje hipofiso-tiroideo de las ratas Gx son coincidentes con la degeneración de los terminales nerviosos. Por ejemplo, el efecto de la Gx sobre la TSH circulante fue detectada al tiempo esperado (14 horas post-cirugía) pero no antes (tabla 25) o después (ver tabla 15).

Tabla: 24

Cambios en la captación de  $^{131}\text{I}$  y concentración sérica de  $T_3$ ,  $T_4$  y TSH en ratas sometidas a gangliectomía (Gx) u operación simulada 14h. antes e inyectadas con 80 uCi de  $^{131}\text{I}$  y 250 mU de TSH bovina o vehículo 1 h. antes.

	<u>Gx</u>	<u>operación simulada</u>
captación de $^{131}\text{I}$ (cpm.g tiroides 1/cpm.ml suero $^{-1}$ )		
vehículo	100.2 $\pm$ 5.4 (5) <sup>a</sup>	128.2 $\pm$ 7.7 (9)
TSH bovina	84.3 $\pm$ 7.6 (8) <sup>a</sup>	120.5 $\pm$ 10.1 (6)
<u><math>T_4</math> sérica (ug/dl)</u>		
vehículo	3.28 $\pm$ 0.28 (6) <sup>b</sup>	4.13 $\pm$ 0.44 (9)
TSH bovina	2.94 $\pm$ 0.26 (8) <sup>b</sup>	6.29 $\pm$ 0.30 (7) <sup>c</sup>
<u><math>T_4</math> libre en suero(ng/ml)</u>		
vehículo	0.95 $\pm$ 0.05 (6) <sup>b</sup>	1.69 $\pm$ 0.11 (9)
TSH bovina	1.15 $\pm$ 0.09 (6) <sup>b</sup>	2.45 $\pm$ 0.09 (7) <sup>c</sup>
<u><math>T_3</math> sérica (ng/dl)</u>		
vehículo	93 $\pm$ 10 (6)	98 $\pm$ 6 (9)
TSH bovina	117 $\pm$ 5 (8) <sup>c</sup>	127 $\pm$ 7 (7) <sup>c</sup>
<u>TSH sérica (ng/ml)</u>		
vehículo	262 $\pm$ 81 (6) <sup>a</sup>	476 $\pm$ 40 (9)
TSH bovina	1252 $\pm$ 201 (7)	1137 $\pm$ 56 (7)

(a)  $p < 0.05$  en relación al control de operación simulada respectivo.

(b)  $p < 0.01$  en relación al control de operación simulada respectivo.

(c)  $p < 0.02$  en relación a su control inyectado con vehículo.



Tabla: 25

Efecto de la gangliectomía (Gx) sobre la concentración sérica de TSH.

Tiempo luego de la cirugía	Gx	operación simulada
3 h.	185 <sup>+</sup> 48 (5)	148 <sup>+</sup> 22 (5)
8 h.	260 <sup>+</sup> 17 (6)	241 <sup>+</sup> 69 (6)
14 h.	104 <sup>+</sup> 20 (5) <sup>a</sup>	339 <sup>+</sup> 20 (5)

(a)

p < 0.01 en relación a su control de operación simulada.



2.2.3.- PARTICIPACION DE LA GLANDULA PINEAL EN LOS EFECTOS DE LA Gx AGUDA:

Dado que la degeneración de los terminales simpáticos luego de la Gx, ocurre también en la glándula pineal, y que mediante la secreción de melatonina, la pineal puede afectar el eje hipófiso-tiroideo (Cardinali, 1981) se examinó la posible participación de esta glándula en los cambios agudos post-Gx. Para ello se sometió a ratas a pinealectomía o a operación simulada y 3 días después, las mismas fueron Gx o sujetas a una Gx simulada. Todos los animales fueron sacrificados 14 horas más tarde.

Como puede observarse en la tabla 26 y cuando se analizaron los resultados por un análisis factorial, pudo concluirse que la Gx produjo a semejanza del experimento de la tabla 24, una depresión significativa de la captación tiroidea de  $^{131}\text{I}$  y de la  $T_4$  total y libre ( $p < 0.01$ ). El análisis estadístico indicó también una interacción significativa entre Gx y pinealectomía, con respecto a los niveles totales de  $T_4$  en suero. Por ejemplo, la Gx disminuyó los valores de  $T_4$  total circulante sólo en presencia de la pineal ( $p < 0.01$ ). Esta interacción, sin embargo, no se demostró en lo que respecta a la  $T_4$  libre.

También se observó una interacción entre ambas operaciones (Gx y pinealectomía) cuando se analizó la respuesta de la TSH circulante. La Gx disminuyó los ni-

Tabla: 26

Cambios en la captación de  $^{131}\text{I}$  y concentración sérica de  $\text{T}_3$ ,  $\text{T}_4$  y TSH en ratas sometidas a pinealectomía (Px) u operación simulada (sham Px) 3 días antes y a gangliectomía (Gx) u operación simulada (sham Gx) 14 h. antes.

	Gx	sham-Gx
captación de $^{131}\text{I}$ (cpm.g tiroides $^{-1}$ /cpm ml suero $^{-1}$ )		
Px	53.4 $^{+6.9}$ (7) <sup>a</sup>	99.9 $^{+6.1}$ (7)
sham Px	65.0 $^{+6.7}$ (7) <sup>a</sup>	93.6 $^{+6.8}$ (7)
$\text{T}_4$ sérica (ug/dl)		
Px	2.34 $^{+0.28}$ (8)	2.56 $^{+0.25}$ (8)
sham Px	2.07 $^{+0.23}$ (7) <sup>a</sup>	2.93 $^{+0.21}$ (7)
$\text{T}_4$ libre en suero (ng/ml)		
Px	1.29 $^{+0.08}$ (7) <sup>a</sup>	1.75 $^{+0.09}$ (8)
sham Px	1.33 $^{+0.11}$ (7) <sup>a</sup>	1.93 $^{+0.08}$ (7)
$\text{T}_3$ sérica (ng/dl)		
Px	77 $^{+6}$ (7) <sup>b</sup>	68 $^{+3}$ (8)
sham Px	56 $^{+6}$ (7)	66 $^{+3}$ (7)
TSH sérica (ng/ml)		
Px	250 $^{+30}$ (7)	227 $^{+27}$ (8)
sham Px	205 $^{+15}$ (7) <sup>a</sup>	288 $^{+13}$ (7)

(a)  $p < 0.01$  en relación a su control sham Gx respectivo.

(b)  $p < 0.05$  en relación a su control sham Px respectivo.

Tabla: 27

Captación de  $^{86}\text{Rb}$  en glándula tiroides, pineal, adenohipófisis e hipotálamo mediobasal de ratas sometidas a gangliectomía (Gx) u operación simulada 14 h. antes.

	$\text{cpm.g tejido}^{-1}$		$\text{cpm.g tejido}^{-1}/\text{cpm ml suero}^{-1}$	
	Gx	op.sim.	Gx	op.sim.
tiroides	77080 $\pm$ 6670 a	126329 $\pm$ 43229	23.0 $\pm$ 2.7	33.2 $\pm$ 5.1
pineal	124428 $\pm$ 11819 b	291124 $\pm$ 44266	41.2 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	75.6 $\pm$ 10.9
hipófisis	56546 $\pm$ 7997	53038 $\pm$ 5418	13.6 $\pm$ 1.1	19.1 $\pm$ 3.8
hipotálamo	8195 $\pm$ 737	11809 $\pm$ 2060	2.6 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.4

Las ratas recibieron 100 uCi de  $^{86}\text{Rb}$ . e.v. 2 minutos antes; n= 7 en cada grupo.

(a)

p < 0.05 (b) p < 0.01, en relación al control respectivo test de t.

## D I S C U S S I O N

## DISCUSION

Si bien la glándula tiroides está regulada por la hipófisis a través de la TSH, existen otros factores de regulación (Sterling y Lazarus, 1977; Dumont y Lamy, 1980).

La tiroides posee un cierto grado de autonomía. La captación de yodo ocurre aún en ausencia de la hipófisis, aunque la formación de  $^{131}\text{I}$ -yodotironinas está disminuída pero no la de  $^{131}\text{I}$ -yodotirosinas. (Taurog y col., 1958).

El papel del yodo en la regulación tiroidea no ha sido aclarado aún. Se acepta que esta acción del yoduro es en parte mediada por sutransformación en hormonas tiroideas, regulando la síntesis y secreción de la TSH. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el yodo puede actuar directamente sobre la tiroides, sin afectar la secreción hipofisaria de TSH en la rata. (Abassi y Mc Kenzie, 1967).

Brownlie y col., (1977) utilizando  $^{99}\text{Tc}$ , demostraron en 101 pacientes que la administración de yodo por 10-14 días disminuye la vascularización tiroidea. No se conoce aún el mecanismo de este efecto.

El yodo tiene diversas acciones clínicas que esquemáticamente podrían clasificarse en rápidas y lentas. Entre las primeras pueden citarse la inhibición de la secreción de las hormonas tiroideas y el bloqueo de la organificación intratiroideo del halógeno (efecto Wolff Chaicoff), entre las tardías se encuentra la disminución del tamaño del bocio.

Se ha demostrado que el contenido de ARN está aumentando en las tiroides de personas con bocio, disminuyendo luego del tratamiento con aceite yodado, lo que coincide con la mejoría clínica del bocio. (Medeiros-Neto y col., 1975).

Trabajos previos de Pisarev y col., (1976a, 1976b) han demostrado que el yodo inhibe la síntesis de ARN tiroideo. luego de haber entrado a la célula y haber sido organificado. Otras acciones del yodo comparten las mismas características. Varios autores (Halmi y Spirtos, 1954, 1955; Burke, 1970; Green, 1970; Van Sande, 1975) estudiando diversos parámetros metabólicos, observaron que el yoduro debía organizarse para ejercer sus efectos inhibitorios.

La naturaleza química de dicho compuesto no ha sido identificada aún. Los yodocompuestos tiroideos sintetizados en mayor proporción son las yodotirosinas (MIT y DIT), pero no pueden ser consideradas como intermediarios de la acción del yoduro, porque existen en la glándula activas deshalogenasas que las inactivan. (Halmi y Pitt Rivers, 1962) y porque además no se ha determinado que tengan actividad biológica. En lo que respecta a las yodotironinas, se conoce su potente acción biológica, variando ésta según el tejido. (Oppenheimer, 1975).

Pisarev y col., (1976b) demostraron que las hormonas tiroideas reproducen la acción inhibitoria del KI sobre la síntesis de ARN. Esta acción fue demostrada utilizando dos precursores diferentes de la síntesis de ARN,  $^3\text{H}$ -uridina y  $^{32}\text{P}$ , así como distintas técnicas de extracción de ARN.

Por otra parte, las yodotironinas mostraron tener mayor potencia inhibitoria que el KI.

Estos resultados y los de otros autores (ver revisión Wolff, 1980) han llevado a postular que el yoduro, mediado por un compuesto orgánico e intracelular, inhibe la síntesis de ARN a nivel transcripcional.

La demostración de una acción directa de la  $T_3$  y la  $T_4$  sobre la biosíntesis de ARN, hace posible que estos compuestos tengan participación en el proceso de autorregulación. Sin embargo, dado que Haibach (1971,a,b) y Green (1978) demostraron que en la tiroides de la rata existe una activa yodotironina deshalogenasa, cabía la posibilidad que en los cortes de tiroides bovina sucediera algo similar. El yodo que se originaría de la deshalogenación de  $T_3$  y  $T_4$  podría ser utilizado para la síntesis de otro compuesto orgánico, que no sería  $T_3$  ó  $T_4$  y que resultaría el intermediario de la acción del yodo.

Los estudios realizados con  $^{125}\text{I}-T_3$  tuvieron como fundamental objetivo develar esta incógnita. El análisis del metabolismo de la  $T_3$  marcada mostró que, bajo condiciones experimentales iguales a las empleadas para demostrar la acción inhibitoria de la  $T_3$  sobre la síntesis de ARN, no se produce una significativa deshalogenación de la misma.

La cantidad de hormona deshalogenada, al cabo de 60 minutos, es menor del 5%. La inhibición de la síntesis de ARN o proteínas tiroideas se observa con concentraciones de  $T_3$

y  $T_4$  del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M, en tanto que a estas concentraciones el KI ya no tiene efecto. Por lo tanto, la pequeña cantidad de yoduro originado no puede explicar la acción inhibitoria de la  $T_3$ .

Se observó también que la adición de PTU 1 mM al medio de incubación inhibe el proceso de deshalogenación. De los resultados publicados resulta que el débil proceso deshalogenativo de yodotironinas que encontramos en tiroides bovina, es similar en magnitud al descrito en tiroides ovina y canina (Roche y col., 1952; Tong y col., 1962) y contrasta con el muy activo descrito en la rata. (Haibach, 1971,a,b; Green, 1978).

Con el conocimiento que, bajo las condiciones de incubación empleadas, la metabolización de la  $T_3$  es despreciable, fue posible estudiar el proceso de entrada de la hormona a la célula tiroidea. Los resultados obtenidos muestran que la  $T_3$  es concentrada intracelularmente, de una manera progresiva. Este proceso es dependiente de la temperatura de incubación y llega a una meseta a los 20-30 minutos. No parece ser dependiente de la síntesis de ATP, proteína o ARN. Tampoco parece involucrar una ATPasa ouabaina dependiente.

El mecanismo de entrada de la  $T_3$  a la célula es específico, ya que la relación T/M no fue alterada significativamente por la adición de  $T_4$ , DIT, MIT o KI al medio de incubación. En cambio, la presencia de  $T_3$  no marcada en concentraciones de  $10^{-9}$  hasta  $10^{-5}$  M, produjo una progresiva disminución de los valores en la relación T/M.



Cuando los cortes de tiroides fueron estimulados previamente con AMPc o GMPc, se observó una significativa y reproducible elevación de la entrada de  $T_3$  a la célula. Estos datos confirman, una vez más, que estos dos nucleótidos tienen una acción paralela estimulatoria sobre la tiroides. (Pisarev y Kleiman de Pisarev, 1977).

Los resultados observados con actinomicina D y con cicloheximida son inesperados. La acción "estimulatoria" de la actinomicina D fue observada repetidamente con dos concentraciones diferentes. Una de las posibles explicaciones es que se tratara de una acción inespecífica de este compuesto, como se describió en otros sistemas biológicos. Sin embargo, la posibilidad que estos compuestos estén inhibiendo la síntesis de una proteína represora de la entrada de  $T_3$  a la célula no puede ser descartada, siendo necesarios otros estudios con el fin de aclarar este punto.

Otro importante punto de apoyo a la hipótesis de que las hormonas tiroideas actúan "per se", inhibiendo la función tiroidea, proviene de los experimentos realizados con MMI y PTU. Se observó que tanto la  $T_3$  como la  $T_4$  mantienen intacta su acción inhibitoria sobre la síntesis de ARN en presencia de PTU y de MMI, drogas que inhiben la organificación del yodo. Esto concuerda y refuerza las conclusiones a las que se arribó al estudiar la metabolización de  $^{125}\text{I}-T_3$ , bajo iguales condiciones experimentales. Otra conclusión, no menos importante, proviene de la demostración que la tiroxina mantiene su acción biológica en presencia del PTU. Este hecho se relaciona con el aún debatido tema acerca de si la  $T_4$  posee acti-

vidad biológica intrínseca. Si bien el PTU inhibe la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  en los tejidos periféricos (Chopra, 1977; Leonard y Rosenberg, 1978; Escobar del Rey y Morreale de Escobar, 1961) pero no en hipófisis y cerebro (Silva y Larsen, 1978; Tanaka, 1981). Chazenbalk y col., (1983 en prensa), demostraron que la  $T_4$  se deshalogena en un 20% en cortes de tiroides bovina y que el PTU no altera el porcentaje metabolizado. Wu (1983) por el contrario, observó en homogenatos de tiroides canina que el PTU bloquea la conversión de  $T_4$  a  $T_3$ . Algunos autores han demostrado que el bloqueo de la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  determina la desaparición de la acción biológica. (Obregón y col., 1980; Larsen y col., 1979, 1981).

En nuestras condiciones el efecto observado puede deberse a que la  $T_4$  aún en presencia de PTU se convierte a  $T_3$  o a algún otro compuesto con actividad biológica, aunque no puede descartarse un efecto de la  $T_4$  "per se", tal cual lo postulan algunos autores. (Chopra, 1978).

Cabe aclarar que las concentraciones de  $T_3$  y de  $T_4$  utilizadas están dentro del rango fisiológico intracelular, de acuerdo a lo publicado por diversos autores. (Nagataki y col., 1972; Henninger y Albright, 1966; Chopra y col., 1973; Larsen y col., 1973).

El hallazgo de una diferencia en el contenido total de yodo entre los tejidos cuya actividad basal (síntesis de ARN) es inhibida por el yoduro y aquéllos que no lo son, provee una explicación a ciertas discrepancias publicadas

en la literatura.

Rapoport y col., (1975) han demostrado que en ratas alimentadas con una dieta rica en yodo, la respuesta de la adenilato ciclase a la TSH está disminuída. Los resultados aquí obtenidos indican que tiroides con un contenido en yodo relativamente bajo son más sensibles a la acción inhibitoria del yodo exógeno y que la falla publicada por algunos autores para encontrar la acción inhibitoria del yodo y yodotironinas, podría ser debida al contenido en yodo relativamente alto de las glándulas utilizadas en sus estudios. Cabe mencionar que se han encontrado variaciones estacionales en el contenido intratiroideo de yodo, (Jonckheer y col. 1982) y en la función tiroidea (Konno, 1980; Pethers y col., 1979; Du Ruisseau, 1965; Lewitus y col., 1964). Otra explicación podría residir en el contenido intratiroideo de yodo en las diferentes especies utilizadas. (Gorbman, 1967).

Se estudió la correlación entre actividad biológica (inhibición de la síntesis de ARN) y las modificaciones en la estructura química de los yodocompuestos. Si bien el número de compuestos estudiados no es suficiente para establecer una correlación definitiva acerca de la estructura necesaria para que se evidencie la acción biológica, se pueden extraer ya algunas conclusiones. La presencia de tres átomos de yodo en la molécula de tironina parece ser necesaria, ya que su disminución a dos (caso de la diyodotironina y su derivado isopropilo) o su ausencia, hacen desaparecer el efecto. Sin embargo, el yodo puede ser reemplazado por otro ha-

lógico, cloro en este caso, sin mayor alteración de la actividad biológica. La cadena  $\alpha$  amino puede ser reemplazada por grupos acetilo o propionilo sin alterar su efecto inhibitorio. Se observa un cambio en la actividad biológica cuando se lo reemplaza por grupos formilo. Es probable que la longitud de la cadena tenga importancia en lo que respecta a su acción biológica. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Money y col., (1959) al estudiar la acción inhibitoria "in vivo" de diferentes compuestos sobre la captación tiroidea de  $^{131}\text{I}$  en la rata. La excepción es la 3, 3' diyodotironina que no tuvo efecto sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN y sí tuvo efecto inhibitorio sobre la captación de  $^{131}\text{I}$ . Koerner y col., (1975) no encontraron unión de la 3, 3' de yodotironina al receptor nuclear de hígado, ni observaron acción biológica de la misma. El DIMIT fue inhibitorio, en coincidencia con los datos publicados por Comite y col., (1978). Al estudiar la prevención del bocio en ratas, encontraron que el dimetil-isopropiltironina es un inhibidor más potente que del dimetil-secbutiltironina. En cambio Jorgensen y Murray (1974) encontraron acción antibocígena de este último compuesto.

El KI inhibe la síntesis de ARN a nivel transcripcional sin afectar la entrada o el metabolismo de los precursores, ni la degradación del ARN (Pisarev y col., 1976; Kleiman de Pisarev y col., 1978). En lo que respecta a la  $T_3$ , no se han hecho esta clase de experimentos por lo que no se puede descartar ninguno de los diferentes sitios de acción en la inhibición de la síntesis del ARN.

Al estudiar la distribución subcelular de la  $T_3$  se encontró alrededor de 1 % de la radiactividad presente en los núcleos tiroideos, la que fue desplazable por el agregado de hormona fría. Este desplazamiento no se observó en otras fracciones subcelulares, indicando al núcleo como un posible lugar de acción específico.

Cuando se estudió la distribución subcelular del  $^{125}\text{I}$ , se observó que un 0,35 %-1,50 % del  $^{125}\text{I}$ , se localizaba en los núcleos. Al realizar el análisis cromatográfico de la radiactividad presente en los núcleos puros, se observó que aproximadamente un 3 % correspondió a la  $T_4$  y un 6 % a la  $T_3$ , mientras que el 11-16 % correspondió al frente de solvente. La radiactividad presente en los núcleos es dependiente de la temperatura y del tiempo de incubación y no se debe a problemas de contaminación. Smith y col., (1961) observaron que alrededor del 12 % del  $^{131}\text{I}$  se encontraba en la fracción de 600 x g de núcleos impuros. De Groot y Davis (1961) encontraron un 2 % de  $T_4$  y un 1 % de  $T_3$  en la fracción de 800 x g, luego de incubar con  $^{131}\text{I}$ .

La radiactividad presente como material del frente de solvente en BEA es de naturaleza lipídica, de acuerdo a los trabajos de Chazenbalk y col., (en trámite de publicación) y la formación de estos yodolípidos está aumentada por la acción de la  $T_3$ . De Groot y Carvalho (1960) observaron la presencia de un yodocompuesto no identificado en el frente de solvente de un homogenato total de tiroides.

Rousset y col., (1980), trabajando con células tiroideas, observaron que la yodinación extracelular produce una cantidad importante de yodolípidos.

Son varios los autores que han observado la formación de diversos yodolípidos no identificados (Dhopeshwarkar y col., 1968; Mauchamp y col., 1963; Posner y Ordoñez, 1969; Shah y col., 1972; Schneider y Wolff, 1965; Taurog y col., 1957) desconociéndose el posible papel fisiológico de los mismos. Shah y col., (1973) observaron que de los diferentes tejidos capaces de concentrar yodo, solamente la tiroides formaba un yodolípido no identificado y que tendría una posible participación en la homogénesis. Nakagowa y col., (1981) observaron que extractos lípidos de microsomas tiroideos estimularon la incorporación de yodo a proteínas.

Boeynaems y col., (1980a, 1981a, 1982) observaron la transformación del ácido araquidónico en una yodolactona en lóbulos tiroideos de ratas, postulando que este compuesto podría tener un rol en el proceso autorregulatorio o ser un intermediario en la yodinación de la tiroglobulina.

Boeynaems y col., (1981b) observaron que el metabolismo del ácido araquidónico en tiroides, está regulado por el  $\text{Ca}^{2+}$ . El ácido araquidónico aumenta la organificación del yodo a proteínas, aunque este efecto depende del estado fisiológico de la célula. Tanto la secreción tiroidea como la acumulación del AMPc inducida por TSH es inhibida por el ácido araquidónico. (Boeynaems y col., 1980b; Gerard y col., 1981).

En la tiroides el ácido araquidónico es liberado por acción de la TSH sobre fosfolipasas específicas para fosfatidilinositol (Haye y Jacquemin, 1977; Igarashi y Kondo, 1980a,b).

La hidrólisis del fosfatidilinositol, jugaría un papel en la regulación de diversos pasos metabólicos (Berridge, 1981). El ácido eicosatetraenoico, inhibidor del metabolismo del ácido araquidónico, no bloquea los efectos inhibitorios de éste. (Haye y col., 1982)

Por lo mencionado, existiría la posibilidad de que algún compuesto yodado de naturaleza lipídica tenga participación en el mecanismo autorregulatorio.

Los estudios de unión de la triyodotironina radiactiva a núcleos purificados, sugieren la presencia de receptores para la  $T_3$  y por lo tanto reforzaría la idea de una acción directa de la misma en la regulación de la función tiroidea.

La presencia de sitios específicos de unión para  $T_3$  ha sido demostrado en varios tejidos. La constante de afinidad para el receptor nuclear es de alrededor de  $10^9$ - $10^{10} M^{-1}$  para los diferentes tejidos estudiados. (Schwartz y Oppenheimer, 1978a,b; Morishige y Guernsey, 1978; Eberhardt y col., 1978; De Groot y Rue, 1979).

La constante de afinidad obtenida para los sitios nucleares en tiroides fue de  $10^8 M^{-1}$  para los sitios de mayor afinidad. Esta relativamente baja constante podría explicarse por la alta concentración endógena de hormona tiroidea. Yagura y Walfish (1982) han demostrado la necesidad de corregir

los datos obtenidos del gráfico de Scatchard por la presencia de hormona endógena. Vacas y Cardinali (1980) encontraron en pineal receptores para melatonina con una constante de afinidad de  $10^6 M^{-1}$ , mientras que en otros tejidos es de  $10^8 M^{-1}$  (Cardinali y col., 1979; Cohen y col., 1978).

Versphol y Ammon (1980), trabajando con islotes de Langerhans de rata, encontraron dos clases de sitios de unión, los de mayor afinidad con una constante de  $2 \cdot 10^9 M^{-1}$ . En otros tejidos la constante de afinidad del receptor para insulina es de aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ .

El tratamiento con enzimas evidencia la necesidad de conservar la integridad de la estructura proteica para la unión de la hormona a sus sitios de unión. El tratamiento con RNAsa no tuvo efecto y la DNAsa disminuyó levemente la unión. Resultados similares se han obtenido con receptores nucleares en hígado. (De Groot y Strauser, 1974; Bellabarba y Lehoux, 1981).

El hecho de no observar desplazamiento de la unión de la  $^{125}I-T_3$  por agregado de hormona no marcada en las diferentes fracciones subcelulares, excepto la nuclear, no descarta que la  $T_3$  pueda actuar directamente en otras organelas. Oppenheimer y col., (1972), realizando experimentos similares en hígado, observaron desplazamiento en el núcleo únicamente. Sin embargo, está comprobado que las hormonas tiroideas, además de actuar a nivel nuclear, tienen efectos directos, encontrándose sitios de unión específicos en la membrana celular (Pliam y Goldfine, 1977; Ingbar y Segal, 1982; Segal e Ingbar, 1979) en mitocondrias (Sterling, 1979; Sterling y



col., 1978; Goglia y col., 1981; Sterling y col., 1979) y se postulan también otros tipos de mecanismos en los cuales no requerirían de un receptor para manifestar su acción. (Dratman y col., 1978; Hulbert, 1978).

Todos estos resultados apoyan la hipótesis postulada por diferentes autores acerca de la existencia de un mecanismo autorregulatorio tiroideo. (Halmi y Stuelke, 1958; Ingbar, 1972). En este sentido cabe señalar que se demostró que si a un animal hipofisectomizado se lo somete a una dieta pobre en yodo, es capaz de adaptarse a la nueva situación, aumentando la captación de yodo. (Studer y col., 1974). Se cree que el contenido intratiroideo de yodo o de algún compuesto yodado es el factor determinante de este mecanismo adaptativo. Sin embargo, la respuesta tiroidea a la privación de yodo es más lenta en condiciones de hipofisectomía, lo que indica la importancia de la TSH en este proceso. Estos mismos autores observaron que en animales sometidos a una dieta pobre en yodo, un aumento significativo de la captación tiroidea de yodo, así como del tamaño glandular (bocio) se produce en etapas tempranas en que los niveles séricos de TSH son aún normales.

Cabe mencionar que si bien en algunas zonas de endemia bociosa, la TSH circulante está elevada (Buttfield y col., 1968; Delange y col., 1971; Coble y Kohler, 1970) en otras sólo lo está marginalmente (Pisarev y col., 1970). La TSH endógena o exógena, en concentraciones fisiológicas, pueden llegar a causar bocio en ratas sometidas a dietas

pobre en yodo (Bray, 1968; Berthier y Lemarchand Beraud, 1978).

Todos estos resultados han llevado a postular que el mecanismo autorregulatorio está vinculado al contenido de yodo o de un compuesto yodado intratiroideo. Cuando la concentración glandular de los mismos disminuye, la célula tiroidea se vuelve más sensible a los niveles de TSH circulante, y activa sus mecanismos: captación de yodo, síntesis hormonal, de ARN, etc. Cuando la concentración intracelular de estos compuestos aumenta la función tiroidea se deprime: bloqueo de la organificación (efecto Wolff-Chaikoff), de la secreción hormonal, de la síntesis de AMPc, de la síntesis de proteínas, etc.

Los elementos de juicio acumulados hasta el presente, indican que este mecanismo es mediado por un compuesto orgánico e intracelular. Dicho compuesto no ha sido identificado aún, y los resultados presentados en parte de esta tesis, apoyarían la idea que las hormonas tiroideas, mediante un mecanismo de retroalimentación super corto, participaría en el mecanismo de autorregulación, sin descartar la presencia de otros yodocompuestos (probablemente yodolípidos) participantes también de dicho mecanismo.

El mecanismo de autorregulación no sería exclusivo de la tiroides. Está descrito en otros sistemas endocrinos mecanismos similares, así por ejemplo, Zacur y col., (1982) observaron que la prolactina inhibe directamente su secreción en hipófisis perfundidas. Rappaport y col., (1972) ob-

servaron lo mismo para la insulina, trabajando con páncreas perfundidos con insulina. Sin embargo, estos resultados no fueron observados por otros autores (Santo y col., 1970). En el humano, De Fronzo y col., (1981) observaron que la administración de insulina inhibió su secreción. Servia y col., (1978) y Beischer y col., (1978) observaron que la administración de insulina inhibía la liberación de insulina basal o estimulada por glucosa en sujetos normales, aunque Shima y col., (1977) no observaron efecto alguno de la insulina sobre su secreción. Ammon y Verspohl (1976) observaron que la insulina, además de inhibir su secreción, ejercía efectos inhibitorios en el metabolismo de la glucosa en islotes pancreáticos. Estos mismos autores (1980) observaron, como se mencionó anteriormente, receptores para insulina en islotes de Langerhans.

La administración de testosterona en testículos perfundidos, inhibe el efecto estimulatorio de la LH en la secreción de testosterona (Darney y Ewing, 1981). El tratamiento "in vivo" en ratas hipofisectomizadas con testosterona, resulta en una menor respuesta testicular a la LH sin haber variación en el número de receptores para LH. La testosterona podría autorregular su secreción. (Chen y col., 1977; Purvis y col., 1979). El  $17\beta$ estradiol inhibe la esteroidogénesis en células de la granulosa (Thanki y Channing, 1978). El efecto luteotrófico de la LH estaría mediado por el estradiol formado en el cuerpo lúteo, a partir de andrógenos. (Gibori y Keyes, 1978; Gibori y col., 1978).

En varios trabajos se ha observado que los corticoides inhiben la corticosteroidogénesis (Birmingham y Kurlents, 1958; Péron y col., 1960; Black y col., 1961). Carsia y Malamad (1979), trabajando con células corticoadrenales aisladas, observaron que el agregado de cortisol o corticosterona al medio de incubación, bloquean el efecto estimulatorio de la ACTH sobre la esteroidogénesis.

Ferguson y col., (1967) y Clayman y col., (1970) observaron que los corticoides inhibe la síntesis proteica y de ARN en adrenales de rata. Los corticoides podrían alterar la unión de la ACTH a sus receptores. (Latner y col., 1977)

En lo que respecta a la participación del simpático en el control de la función tiroidea, este sistema ha sido examinado en experimentos, tanto in vivo como in vitro.

En el último tipo de estudios se ha observado que la epinefrina y norepinefrina en concentraciones farmacológicas estimulan, (Melander y Sundler, 1972; Maayan e Ingbar, 1970; Juvenal y col., 1978; Spaulding y Burrow, 1975), inhiben (Sherwin y Mills, 1980; Maayan y col., 1977; Melander y col., 1972) o carecen de efecto sobre la función tiroidea (Ahn y col., 1969; Ericsson y col., 1970; Mowbray y Peart, 1960; Falconer, 1967). La inyección intravenosa de dosis farmacológicas de epinefrina o norepinefrina a perros (Mowbray y Peart, 1960) u ovejas (Falconer, 1967) altera el flujo sanguíneo tiroideo sin modificar la secreción hormonal. Una in-

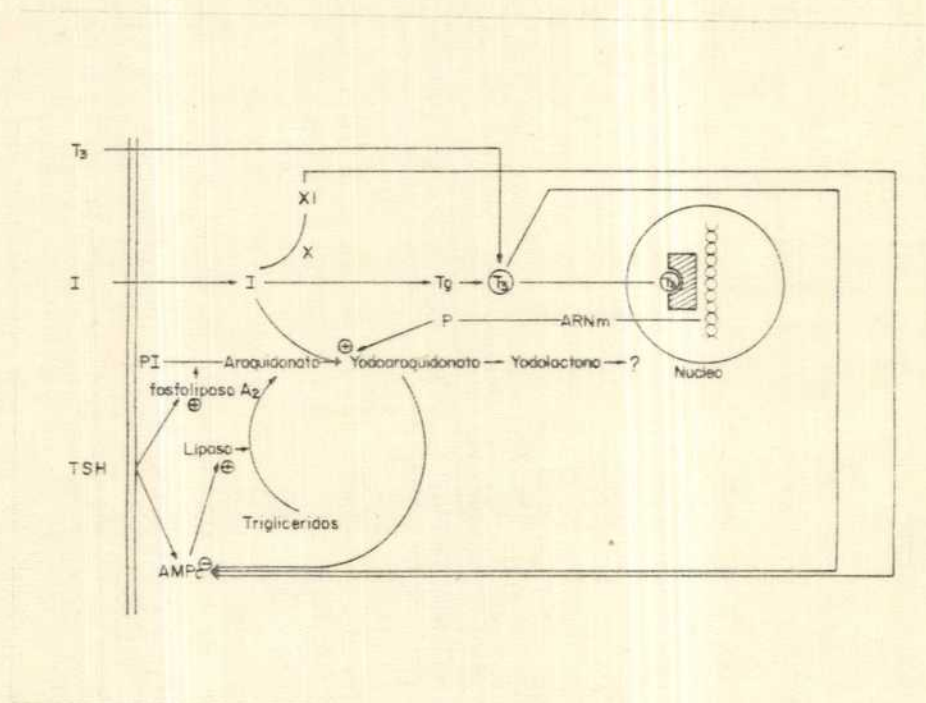


Fig. 26 - Posibles rutas metabólicas del yodo en el mecanismo de autorregulación.

fusión continua de epinefrina produce vasoconstricción tiroidea en conejos (Brow-Grant y Gibson, 1956) con la concomitante depresión de la captación de  $^{131}\text{I}$ ; una disminución semejante se observó en ratas luego de la administración sistémica de epinefrina (Botkin y Jensen, 1962). En el hombre (Hays, 1965) se han registrado efectos estimulatorios de una inyección aguda de epinefrina mientras que la infusión de la misma deprime la captación de  $^{131}\text{I}$ .

Melander y col., han demostrado en el ratón, que la inyección de epinefrina y norepinefrina aumenta el número de gotas de coloide y la liberación de  $^{131}\text{I}$ , exclusivamente en animales tratados con  $\text{T}_4$ . (Melander y Sundler, 1972; Melander y col., 1975). En ausencia de dicho pretratamiento, ambas catecolaminas disminuyen la liberación de hormonas tiroideas (Melander y col., 1972) o carecen de efecto (Ericsson y col., 1970). La estimulación unilateral del GCS de ratones tratados con  $\text{T}_4$  produce un incremento significativo en el número de gotas coloides del lóbulo ipsilateral y un incremento en el  $^{131}\text{I}$  sanguíneo (Melander y col., 1972). Los mismos autores (Melander y col., 1977) han demostrado que la inyección del neurotóxico adrenérgico 6-hidroxidopamina en dichos animales tratados con  $\text{T}_4$  aumenta la formación de gotas de coloide, dentro de las 24 horas.

Sin embargo, se hace difícil sacar conclusiones sobre estos trabajos, por cuanto el tratamiento con  $\text{T}_4$ , además de inhibir la secreción de TSH, actúa sobre la tiroides y

sobre los terminales simpáticos alterando la situación fisiológica normal. (Dratman, 1978)

Uno de los objetivos de los experimentos realizados fue aclarar el confuso panorama de las interrelaciones "sistema simpático cervical-glándula tiroides", recurriendo a diseños experimentales que no implicaran la administración de dosis farmacológicas de catecolaminas. Los presentes experimentos se planearon para responder a dos preguntas:

- ¿Cómo reacciona la tiroides desnervada por la remoción de sus fibras simpáticas a estímulos que condicionan la producción de bocio?.
- ¿Cómo se modifica la función tiroidea durante la liberación aumentada de transmisor en el territorio simpático correspondiente?.

En una primera serie de experimentos, se observó que la inyección del agente bociógeno MMI a animales sometidos a Gx bilateral, una semana antes, aumentó significativamente el peso tiroideo por sobre el nivel observado en los animales controles. El GCS, además de inervar la glándula tiroides, provee inervación simpática a estructuras cefálicas y cervicales como las glándulas submaxilar y pineal (Cardinali, 1981; Cardinali y col., 1981); es responsable de la regulación vasoconstrictora de los vasos cerebrales e hipofisarios y controla la secreción del plexo coroideo (Lindvall y col., 1978), (Fig. 26). Puesto que bajo ciertas circunstancias la glándula pineal, parece afectar la función tiroidea en forma inhibitoria a nivel de la secreción de TSH o periféricamente

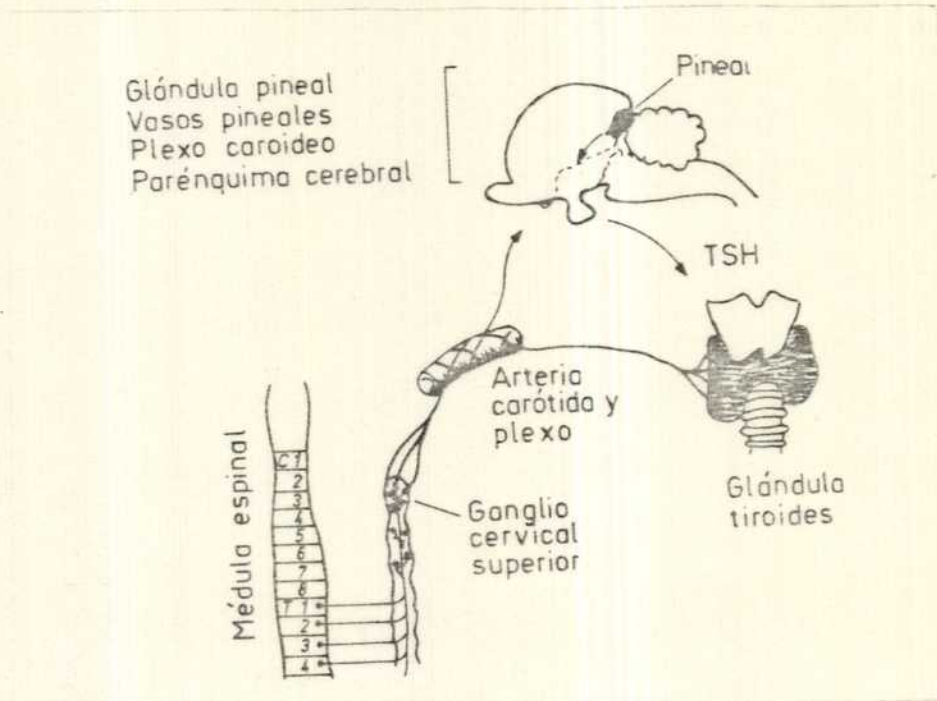


Fig. 26- Principales estructuras inervadas por el ganglio cervical superior en los mamíferos.



sobre la misma glándula (Nir, 1978; Vriend y col., 1979; Narang y col., 1967; Relking, 1972; Vriend y col., 1980).

Los resultados obtenidos pueden ser interpretados de diferentes maneras; la Gx crónica: a). remueve una señal inhibitoria directa sobre los ácinos tiroideos; b). actúa indirectamente a través de una pinealectomía funcional (o de cualquier otro fenómeno de origen central que afecte la secreción de TSH); c). modifica la sensibilidad tiroidea al MMI; d). por depleción del neurotransmisor adrenérgico produce vasodilatación tiroidea y por lo tanto mayor aporte relativo de TSH al ácino tiroideo. Los experimentos subsiguientes fueron realizados para elucidar las distintas posibilidades planteadas.

Al observar que el bocio, en las ratas pinealectomizadas o sometidas a operación simulada 7 días antes, fue semejante y se pudo descartar la participación de la glándula pineal en los cambios tiroideos observados a largo tiempo, luego de la Gx (pero no los cambios agudos, como se verá más adelante).

Una posible participación de otros fenómenos centrales a través de cambios en la secreción de TSH, no se vio tampoco avalada por los hechos experimentales, ya que los niveles de TSH fueron semejantes en ratas controles o gangliectomizadas. El bocio producido por TSH fue a su vez mayor en ratas Gx, lo que no apoya la posibilidad de que el incremento en la respuesta bociógena al MMI se deba a un aumento en la sensibilidad de la tiroides desnervada a dicho agente farmacológico.

Siete días post Gx, la síntesis de ARN aumentó en un 65%, sin cambios significativos en el peso tiroideo. En forma espontánea, en los animales Gx se observa 30 días luego de la resección ganglionar un bocio. Más aún, la Gx unilateral que produce una depresión de 80-90% de los niveles de neurotransmisor sólo en el lóbulo tiroideo ipsilateral, indujo un bocio espontáneo en el lóbulo dernervado. El contenido de yodotironinas por mg de tejido fue significativamente menor en el lóbulo desnervado.

Estos datos constituyen una fuerte evidencia en favor de cambios locales en la sensibilidad a la TSH de desarrollo paulativo y como consecuencia de la desaparición de la inervación simpática local.

¿De qué forma puede la destrucción crónica del sistema simpático cervical afectar localmente la función tiroidea?. Una respuesta a esta pregunta es que la remoción del GCS trae aparejado un aumento del flujo sanguíneo tiroideo por vasodilatación, incrementándose así la respuesta de la glándula tiroides a niveles normales circulantes de TSH. Para estudiar el efecto de la Gx sobre el flujo sanguíneo tiroideo, se realizaron los experimentos con  $^{86}\text{Rb}$  que demostraron que en siete (7) días post Gx, existe una disminución más que un aumento de captación del radioisótopo por la glándula tiroides, hecho que se observó también en otras estructuras inervadas por el simpático cervical como la glándula pineal, confirmando los resultados de Goldman (1967).

Estas observaciones descartan que los cambios locales producidos por la desnervación simpática crónica de la glándula tiroidea sean debidos a un aumento en el flujo sanguíneo. Se puede concluir por lo tanto, que estos datos tienden en conjunto a apoyar la existencia de un vínculo directo entre las neuronas simpáticas cervicales y las células endócrinas tiroideas, del tipo del descrito en otros transductores neuroendócrinos, como el aparato yuxtaglomerular renal y la glándula pineal. (Wurtman, 1973; Cardinali, 1979).

La desaparición de los terminales simpáticos tiroideos, con la consiguiente disminución de la concentración glandular de norepinefrina, condujo 7 días más tarde a un incremento en el número de  $\alpha$ -adrenoreceptores tiroideos, sin modificación de los de tipo  $\beta$ . Las constantes de equilibrio para ambos adrenoreceptores tiroideos, no difieren de las descritas en otros órganos, (Williams y Lefkowitz, 1978). Es de destacar que la posible supersensibilidad adrenérgica- $\alpha$  sugerida por el aumento de sitios, en este trabajo se correlaciona con observaciones previas (Juvenal y col., 1978) que indican que los cambios por TSH de la síntesis de ARN en trozos de tiroides bovina están vinculados a un mecanismo adrenérgico de tipo  $\alpha$ .

Se decidió también estudiar los cambios que se producen en el eje hipófiso-tiroideo durante el proceso de degeneración de los terminales simpáticos, luego de la sección del ganglio cervical superior. Del terminal en destrucción se libera norepinefrina y ésta actúa postsinápticamente a

nivel de sus receptores.

Esta liberación supraliminar, que ocurre en forma temporaria, lleva a una hiperfunción adrenérgica transitoria en el órgano inervado. Se ha descripto que en la membrana nictitante, glándulas salivares y músculos preorbitarios, luego de la Gx y dependiendo de la longitud axonal, se produce una liberación de norepinefrina de las varicosidades que comienza a las 8-10 horas y dura una 6-8 horas, hasta que la degeneración de los terminales se completa. (Almgren y col., 1976; Emmelin y Trendelenburg, 1972; Häggendal, 1980; Stefano y col., 1974). Este fenómeno también se observó en la glándula tiroides. (Fig. 24)

Como se discutió anteriormente en el caso del eje hipofiso-tiroideo, se pueden postular dos sitios posibles como efectores de la acción del GCS. Por un lado, el GCS provee inervación a la tiroides, modulando directamente la función de esta glándula. (Melander, 1978; Melander y col., 1974). Por el otro, el GCS inerva diversas estructuras del SNC, pudiendo afectar la liberación de TSH por un efecto central. (Alper y col., 1980; Cardinali y col., 1981; Cardinali y col., 1982; Falck y col., 1965; Lindvall y col., 1978).

Los valores de TSH,  $T_4$  total y libre en suero y la captación tiroidea de  $^{131}\text{I}$  (tabla 24) disminuyen luego de 14 horas post Gx, lo que indica que durante el proceso de degeneración nerviosa se produce una inhibición del eje hipofiso-tiroideo.

Esta inhibición no se explicaría por una disminución de los niveles séricos de TSH, por cuanto ni la inyección de TSH revirtió el efecto depresor de la Gx aguda sobre la secreción de  $T_4$ , ni la Gx en ratas pinealectomizadas, en las que no se observa disminución de la TSH sérica, es aún efectiva para disminuir la captación de  $^{131}\text{I}$  o la fracción libre circulante de  $T_4$  (considerada como un parámetro adecuado de la secreción tiroidea. (Oppenheimer y Surks, 1974).

Durante la liberación supraliminal del neurotransmisor de los terminales adrenérgicos tiroideos, se produce una modulación negativa del efecto de la TSH sobre los acinos, situación opuesta a la observada luego de la desaparición de dichos terminales.

Los experimentos realizados con  $^{86}\text{Rb}$  indicarían una disminución en el flujo sanguíneo y esto podría explicar por qué durante la degeneración de los terminales simpáticos no existe respuesta a la TSH endógena o exógena; sin embargo existen evidencias, en estudios realizados in vitro, de un antagonismo entre la norepinefrina y la TSH sobre la secreción de hormonas tiroideas. (Maayan y col., 1977; Melander y col., 1972; Munak y col., 1982).

Durante la Gx aguda existe un efecto inhibitorio sobre la liberación, que no se observa en la crónica. Como se comentó anteriormente, la glándula pineal está inervada por el GCS y podría jugar un papel en la regulación

de la TSH. Relkin (1972) observó que la pineal ejerce una influencia negativa sobre la secreción de TRH. Los niveles séricos de TSH y de yodoproteínas estaban aumentados 3 días post gangliectomía. La inyección de melatonina deprime la TSH sérica (Relkin, 1978), resultados confirmados por Vriend y col., (1982). Panda y Turner (1968), por el contrario observaron que la administración de melatonina podría actuar directamente sobre la tiroides.

Brammer y col., (1979) no observaron efecto alguno de la melatonina sobre la secreción de TSH, al igual que Mattila y Männistö después de 3-4 días post pinealectomía.

Vriend y col., (1980) aislaron de extractos pineales bovinos libre de melatonina, un péptido bloqueador de los receptores para TRH. (Ver revisiones de Vriend, 1978 y 1981; Cardinali, 1981).

Como en la pineal, la degeneración de los terminales simpáticos ocurre 8-18 horas post Gx (Morgan y Hansen(1978) y la liberación supraliminar de norepinefrina podría estimular la secreción pineal (La concentración de melatonina en la pineal aumenta de 6 a 8 veces; Cardinali y Vacas, datos no publicados), se decidió estudiar el efecto de la Gx aguda en ratas pinealectomizadas.

Los resultados de la tabla 26 indican que la presencia de pineal, con nervios en degeneración es necesaria para la acción depresiva de la Gx sobre la secreción de TSH y la  $T_4$  total circulante. En cambio, la glándula pineal no parece

jugar un papel en la disminución de la  $T_4$  libre sérica ni en la captación tiroidea de  $^{131}\text{I}$ .

La depresión de la secreción de TSH, luego de la Gx podría deberse a los niveles de melatonina o de péptidos inhibidores de TRH aumentados como consecuencia de la liberación supraliminal de neurotransmisor en la glándula pineal.

Se han encontrado efectos de la Gx, dependientes en parte de la presencia de la pineal, en el hipotálamo medio basal (Cardinali y col., 1981); por lo tanto, cabe la posibilidad que la glándula pineal sea necesaria para que ocurra la degeneración de los terminales nerviosos que controlan la secreción de TSH en otras áreas del cerebro. (Morley, 1981).

La observación de que la captación de  $^{86}\text{Rb}$  no se modifica en la hipófisis o en el hipotálamo medio basal, descarta la posibilidad que la caída de los niveles séricos de TSH luego de la Gx, se deba a fenómenos vasculares en el eje hipotálamo-hipofisario.

## C O N C L U S I O N E S



V). CONCLUSIONES:

Como se ha visto en la Introducción, además de la TSH, existen otros factores de regulación de la glándula tiroides, ya sea actuando directamente o mudalando la acción de la TSH.

La importancia del yodo en el mecanismo autorregulatorio ha sido analizada por varios autores, aceptándose que el responsable de este mecanismo es un compuesto organificado del yodo. La naturaleza química del mismo es desconocida. Los resultados aquí presentados indicarían que la triyodotironina tendría una acción directa sobre la glándula tiroides.

En resumen, se ha podido responder a los siguientes interrogantes planteados en la Introducción, de esta manera:

- Las hormonas tiroides inhiben la síntesis de ARN tiroideo.
- Se demuestra cuáles son los grupos funcionales de la molécula de las yodotironinas importantes para esta acción inhibitoria.
- La  $T_3$  penetra dentro de la célula tiroidea mediante un mecanismo dependiente de la temperatura y específico.
- La  $T_3$  no es metabolizada en forma significativa bajo las condiciones en que inhibe la síntesis de ARN.

- La triyodotironina, exógena o endógena se uniría a receptores nucleares para ejercer su acción regulatoria. Se han descripto las características de estos receptores.
- La diferente sensibilidad observada entre tiroides a la acción inhibitoria del yodo y/o yodotironinas, es función de su contenido intratiroideo de yodo.

Se estudió también la influencia del SNC sobre la funcción tiroidea. Los presentes resultados indican que el GCS ocupa un lugar importante en la regulación del eje hipófiso-tiroideo:

- La norepinefrina liberada por los nervios simpáticos tiroideos deprime la actividad glandular y la respuesta a la TSH, y ante una interrupción de dicha vía neural, se desencadena el crecimiento glandular.
- Se demuestra la existencia de sitios de unión  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en tiroides. El aumento en el número de sitios de unión  $\alpha$ -adrenérgicos post Gx, sería una de las causas de la mayor sensibilidad de la tiroides a la TSH.
- Por otra parte, el GCS modula la función tiroidea por cambios centrales en la secreción de TSH como se concluye en los experimentos de Gx aguda.

Dado que el GCS recibe e integra un número importante de señales endócrinas hipofisarias y gonadales, ha sido propuesto como un centro neuroendocrino. (Cardinali y col., 1981). Los presentes resultados apoyan dicha idea y la posibilidad de una conexión entre el GCS y el mecanismo auto-

rregulatorio, al observar una disminución de hormonas tiroideas post Gx, es objeto de continuados estudios en nuestro laboratorio, a fin de profundizar los diferentes mecanismos de regulación tiroidea.

R E F E R E N C I A S

R E F E R E N C I A S

- Abassi V., Mc Kenzie J.  
Lack of Iodide effect on serum and pituitary thyrotropin in vivo. Endocrinology 81:871, 1967.
  
- Abramowitz J., Iyengar R., Birnbaumer L.  
Guanyl nucleotide regulation of hormonally-responsive adenyl cyclases. Molec. and Cell. Endocrinology 16:129, 1979.
  
- Adiga P., Murthy P., Mac Kenzie J.  
Stimulation of thyrotropin, LATS and dibutyryl-3',5' AMP of protein and RNA synthesis and RNA polymerase activities in porcine thyroid in vitro. Biochemistry 10:702, 1971.
  
- Ahn C.  
Glycogen metabolism of the thyroid. Endocrinology 88:1341, 1971.
  
- Ahn C., Rosenberg I.  
Iodine metabolism in thyroid slices: affects of TSH, dibutyryl 3',5' AMP, Na F and prostaglandin E<sub>1</sub>. Endocrinology 86:396, 1970.
  
- Ahrén B., Hedner P., Melander A., Westgren U.  
Inhibition of somatostatin of mouse thyroid activity following stimulation by thyrotrophin, isoprenaline and dibutyryl cyclic-AMP. Acta Endocrinológica 86:323, 1977.
  
- Aiyoshi Y., Yamashita K., Fujimoto Y.  
Effect of thyroid-stimulating hormone and norepinephrine on cyclic AMP levels in human normal thyroids and human thyroid tumors. Endocrinol. Japon 27:625, 1980.

- Aiyoshi Y., Yamashita K., Yamashita S., Ogata E.  
Effects of norepinephrine on cyclic nucleotide levels in dog thyroid slices. *Endocrinology* 102:1527, 1978.
  
- Albert A., Rawson R., Riddell C., Merrill P., Lennon B.  
In vivo argumentation of thyrotropic hormone and partial reactivation of iodinated (inactive) thyrotropic hormone extract by goitrogens. *Endocrinology* 40:361, 1947.
  
- Alexander W., Wolff J.  
Thyroid iodide transport-VIII-Relation between transport, goitrogenic and antigoitrogenic properties of certain anions. *Endocrinology* 78:581, 1966.
  
- Almgren O., Dahlstrom A., Häggendal J.  
Degeneration secretion and noradrenaline disappearance in rat salivary glands following proximal or distal axotomy. *Acta Physiol.Scand.* 98:457, 1976.
  
- Alper R., Demarest K., Moore K.  
Effect of surgical sympathectomy on catecholamine concentration in the posterior pituitary of the rat. *Experientia* 36:134, 1980.
  
- Altman M., Oka H., Field J.  
Effect of TSH, acetylcholine, epinephrine, serotonin and synkavite on  $^{32}\text{P}$  incorporation into phospholipids in dog thyroid slices. *B.B. Acta* 116:586, 1966.
  
- Amir S., Carraway T. (Jr), Kohn L.  
The binding of thyrotropin to isolated bovine thyroid plasma membranes. *J.Biol.Chem.* 248:4092, 1973.
  
- Amir S., Ingbar S.  
On the thyrotropic activity of human chorionic gonadotropin: its role as the thyroid stimulator of trophoblastic origin. *En New Concepts in Thyroid Disease.* 207, Alan Liss, 1983.

- Amir S., Sullivan R., Ingbar S.  
The effects of desialylation on the in vitro interaction of human chorionic gonadotropin with human thyroid membranes. Endocrinology 109:1203, 1981.
- Ammon H., Verspohl E.  
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin. Endocrinology 99: 1469, 1976.
- Anderson E., Evans H.  
The effect of thyrotropic hormonal combined with small amounts of iodine upon the function of the thyroid gland. Am.J. of Physiol. 120:527, 1937.
- Arimura A., Schally A.  
Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated secretion of thyrotropin (TSH) by passive immunization with antoserum to somatostatin in rats. Endocrinology 98:1069, 1976.
- Astwood E., Bissell A.  
Effect of thiouracil on the iodide content of the thyroid gland. Endocrinology 34:282, 1944.
- Aterini S., Rotella C., Tanini A., Zonefrati R., Toccafondi R.,  
Inhibition of thyrotrophin stimulated stimulated cAMP accumulation by human cultured thyroid cells. FEBS letters, 121:44, 1980.
- Azukizawa M., Kurtzman G., Pekary A., Hershman J.  
Comparison of the binding characteristics of bovine thyrotropin and human chorionic gonadotropin to thyroid plasma membranes. Endocrinology 101:1880, 1977.

- Barmasch M., Pisarev M., Altschuler N.  
Guanyl cyclase activity in rat thyroid tissue. Acta Endocrinol. Panam. 4:19, 1973.
  
- Bastomsky C.  
Thyroid iodide transport. En Handbook of Physiology-Endocrinology sec. VII, VIII, eds. R.Greep, E.Astwood, Washington DC. Amer Physiol. Soc. cap. 6:81, 1974.
  
- Bech K., Feldt-Rasmussen U., Nistrup Madsen S.  
Influence of thyroglobulin on basal and stimulated human thyroid adenylate cyclase activity. J.Clin.Endocr.Metab. 53:264, 1981.
  
- Begg D., Munro H.  
Action of thyroid stimulating hormone on acid synthesis slices and in isolated thyroid nuclei. Nature 207:483,1965.
  
- Beischer W., Schmid M., Kerner W., Keller I., Pfeiffer E.  
Does insulin play a role in the regulation of its own secretion. Horm.Metab. Res. 10:168, 1978.
  
- Bellabarba D., Lehoux J.  
Triiodothyronine nuclei receptors in chick embryo: nature and properties of hepatic receptor. Endocrinology 109:1017, 1981.
  
- Bellabarba D., Peterson R., Sterling K.  
An improved method for chromatography of iodothyronines. J. Clin. Endocrinol. Metab. 28:305, 1968.
  
- Benhua R., Lipsett M.  
The effect of iodide on the action of thyrotrophin in the hypophysectomized patients. J. Clin. Endocrinol. Metab. 19:19, 1957.



- Berkowitz M., Daughtridge D., Sherwin J.  
Autorregulation of thyroid iodide transport: possible mediation by modification in sodium cotransport. Am.J.Physiol. 240:37, 1981.
- Bernal J., Coleoni A., De Groot L.  
Thyroid hormone receptors from liver nuclei: characteristics of receptor from normal, thyroidectomized and triiodothyronine-treated rats; measurement of occupied and unoccupied receptors and chromatin binding of receptors. Endocrinology 103:403, 1978.
- Bernal J., De Groot L.  
Thyroid hormone receptors: release of receptors to the medium during in vitro incubation of isolated rat liver nuclei. Endocrinology 100:648, 1977.
- Berridge M.  
Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. Mol.Cell.Endocrinol. 24:115, 1981.
- Berson S., Yalow R.  
The effect of cortisone on the iodine accumulating function of the thyroid gland in euthyroid subjects. J.Clin. Endocrinol.Metab. 12:407, 1952.
- Berthier C., Lemarchand-Béraud T.  
Importance of thyroid iodine and cyclic AMP, and TSH concentrations on goitre formation in rats. Acta Endocrinol.(Kbh) 89:567, 1978.
- Birmingham M., Kurlents E.  
Inactivation of ACTH by isolated rat adrenals and inhibition of corticoid formation by adrenocortical hormones. Endocrinology 62:47, 1958.

- Bjorkman U., Ekholm R.  
Thyroglobulin syntesis and intracellular transport studied in bovine thyroid slices. J.Ultraestruct.Res.4:231, 1973.
- Bjorkman U., Ekholm R., Ericson L., Elmquist L., Melander A., Smeds S.  
Induced unidirectional transport of protein into the thyroid follicular lumen. Endocrinology 95:1506, 1974.
- Black W., Crampton R., Verdesca A., Nedeljkovic R., Hilton J.  
Inhibitory effect of hydrocortisone and analogues on adrenocortical secretion in dogs. An.J.Physiol. 201:1057,1961.
- Boeynaems J.  
Pharmacological actions of prostaglandins on the thyroid gland. En: Handbook of prostaglandins and related compounds, 46; Churchill-Livingstone, London, 1983.
- Boeynaems J., Hubbard W.  
Transformation of arachidonic acid into and iodolactone by the rat thyroid. J. of Biol. Chem. 255:9001, 1980a.
- Boeynaems J., Pelster D., Oaetes J., Hubbard W.  
Novel transformations of arachidonic acid by the rat thyroid in vitro. B.B.Acta 665:623, 1981b.
- Boeynaems J., Van Sande J., Decoster C., Dumont J.  
In vitro effects of arachidonic acid and of inhibitors of its metabolism on the dog thyroid gland. Prostaglandin 19: 537, 1980b.
- Boeynaems J., Van Sande J., Dumont J.  
Blocking of dog thyroid secretion in vitro by inhibitors of prostaglandins synthesis. Biochemical Pharmacology 24:1333, 1975.

- Boeynaems J., Van Sande J., Hubbard W., Dumont J.  
Metabolism of arachidonic acid in the thyroid gland:  
enzyme pathways, regulation and significance. En Hormones  
and Cell Regulation 6:37, Elsevier Biomedical Press, 1982.
- Boeynaems J., Watson J., Oates J., Hubbard W.  
Ionidation of docosaehaenoic acid by lactoperoxidase and  
thyroid gland in vitro: formation of an iodolactone.  
Lipids 16:323, 1981a.
- Boeynaems J., Wolbroeck M., Dumont J.  
Cholinergic and  $\alpha$ -adrenergic stimulation of prostaglandin  
release by dog thyroid in vitro. Endocrinology 105:988,  
1979.
- Botkin A., Jensen H.  
The effect of epinephrine and thyrotropin on thyroid func-  
tion in rats. Endocrinology 50:68, 1952.
- Brammer G., Morley J., Geller E., Yuwiller A., Hershman  
J.  
Hypothalamus-pituitary-thyroid axis interactions with pi-  
neal gland in the rat. Am.J.Physiol. 236:416, 1979.
- Braverman L., Ingbar S.  
Changes in thyroid function during adaptation to large do-  
ses of iodide. J.Clin. Invest. 42:1216, 1963.
- Bray G.  
Increased sensitivity of the thyroid in iodine depleted  
rats to the goitrogenic effects of thyrotropin. J.Clin.  
Invest. 47:1640, 1968.
- Brisson-Lougarre A., Blum C.  
Synthèse protéique thyroïdienne et insuline: influence de  
la concentration de l'hormone. Annales d'Endocrinologie  
(Paris)40:437, 1979.

- Brisson-Lougarre A., Blum C., De Nayer P.  
Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs.  
Horm. Metab. Res. 10:396, 1978.
- Brown Grant K., Gibson J.  
The effect of exogenous and endogenous adrenaline on the uptake of radio-iodine by the thyroid gland of the rabbit.  
J. Physiol. 131:85, 1956.
- Brownlie B., Turner J., Ellwood M., Rogers T., Armstrong D.  
Thyroid vascularity-documentation of iodide effect in thyrotoxicosis. Acta Endocrinológica (Kbh) 86:317, 1977.
- Brunberg J., Halmi N.  
The role of ouabain-sensitive adenosine triphosphate in the stimulating effect of thyrotropin on the iodide pump of the rat thyroid. Endocrinology 79:801, 1966.
- Burke G.  
Effect of inorganic iodide on thyroid stimulation in vitro. Endocrinology 82:1170, 1968a.
- Burke G.  
Effects of iodotyrosines on basal and stimulated glucose oxidation and phospholipogenesis in sheep thyroid slices. Endocrinology 83:495, 1968b.
- Burke G.  
Effects of adrenergic blocking agents on basal and stimulated thyroid function. Metabolism 18:961, 1969.
- Burke G.  
Effects of iodide on thyroid stimulation. J.Clin.Endocrinol Metab. 30:76, 1970.

- Burke G., Szabo M.  
Effects of thyroglobulin on thyroid function. J.Clin. Endocrinol. Metab. 35:552, 1972.
- Burke G., Chang L., Szabo M.  
Thyrotropin and cyclic nucleotides: effects on prostaglandin levels in isolated thyroid cells. Science 180:872, 1973.
- Burton K.  
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem J. 62:315, 1956.
- Buttfield I., Hetzel B., Odell W.  
Effects of iodized oil on serum TSH determined by immunoassay in endemic goiter subjects. J.Clin. Endocrinol. Metab. 28:1664, 1968.
- Carayon P., Lefort G., Nisula B.  
Interaction of human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone with human thyroid membranes. Endocrinology 106:1907, 1980a.
- Carayon P., Amr S., Nisula B.  
A competitive antagonist of thyrotropin: asialo-choriogonadotropin. B.B.Res. Commun. 97:69, 1980b.
- Cardinali D.  
Models in neuroendocrinology: Neurohumoral pathways to the pineal gland. Trends in Neurosci 2:250, 1979.
- Cardinali D.  
Melatonin. A mammalian pineal hormone. Endocrinol. Rev. 2:327, 1981.

- Cardinali D., Gomez E., Rosner J.  
Changes in  $^3\text{H}$ -leucine incorporation into pineal proteins following estradiol or testosterone administration. Involvement of the sympathetic superior cervical ganglion. Endocrinology 98:849, 1976.
  
- Cardinali D., Vacas M., Estevez Boyer E.  
Specific binding of melatonin in bovine brain. Endocrinology 105:437, 1979.
  
- Cardinali D., Vacas M., Gejman P.  
The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. J. Neural Transm. 52:1, 1981a.
  
- Cardinali D., Vacas M., Portis A., Stefano F.  
Superior cervical ganglionectomy depresses norepinephrine uptake, increases the density of  $\alpha$ -adrenoreceptor sites, and induces supersensitivity to adrenergic drugs in rat medial basal hypothalamus. Neuroendocrinology 33:199, 1981b.
  
- Carsia R., Malamad S.  
Acute self-suppression of corticosteroidogenesis in isolated adrenocortical cells. Endocrinology 105:911, 1979.
  
- Cavalieri R., Pitt-Rivers R.  
The effects of drugs on the distribution and metabolism of thyroid hormones. Pharmacol. Rev. 33:55, 1981.
  
- Clarck O., Gerand P., Nissenson R.  
Thyrotropin binding and adenylatecyclase activation in normal and neoplastic human thyroid tissue: lack of effect of thyroglobulin. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54:1157, 1982.
  
- Clayman M., Tsong D., Johnstone K.  
ACTH-corticosteroids and inhibition of protein synthesis. Endocrinology 86:931, 1970.

- Coble Y.(Jr), Kohler P.  
Plasma TSH levels in endemic goiter subjects. J. Clin. Endocrinol.Metab. 31:220. 1970.
- Codaccioni J., Carayon P., Michel-Bechet, Foucault F., Lefort G., Pierron H.  
Congenital hypothyroidism associated with thyrotropin unresponsiveness and thyroid cell membrane alterations. J.Clin. Endocrinol. Metab. 50:932, 1980.
- Cohen M., Roselle D., Chabner B.  
Evidence for a cytoplasmic receptor. Nature 274:894, 1978.
- Cohen J., Utiger R.  
Metastatic choriocarcinoma associated with hyperthyroidism. J.Clin.Endocrinol.Metab. 30:423, 1970.
- Colle-Vandervelde A., Elewaut J.  
Secretion hormonale in vitro par des fragments thyroïdiens de souris: influence de l'hydrocortisone. C.R.Acad. Sci. (Paris) 273:894, 1971.
- Comite F., Burrow G., Jorgensen E.  
Thyroid hormone analogs and fetal goiter. Endocrinology 102:1670, 1978.
- Cortell R., Rawson R.  
The effect of thyroxine on the response of the thyroid gland to thyrotropic hormone. Endocrinology 35:488, 1944.
- Croxon M., Hall T., Jaramillo J., Nicoloff J.  
Lack of indomethacin effect on thyroid function in man. J. Clin. Endocrinol.Metab. 44:748, 1977.

- Czarnocka B., Gardas A., Nauman J.  
Thyrotropin binding glycoprotein isolated from bovine thyroid. Acta Endocrinol. (Kbh) 96:335, 1981.
- Champion S., Haye B., Jacquemin C.  
Cholinergic control by endogenous prostaglandins of cAMP accumulation under TSH stimulation in the thyroid. FEBS Letters 46:289, 1974.
- Champion S., Jacquemin C.  
The role of cyclic GMP in the action of carbamyl-choline on the cyclic AMP level in the dog thyroid. FEBS Letters 92:156, 1978.
- Champion S., Mauchamp J.  
Muscarinic cholinergic receptors on cultured thyroid cells. I. Biological effect of carbachol and characterization of the receptors. Molecular Pharmacology 21:66, 1982a.
- Champion S., Mauchamp J.  
Muscarinic cholinergic receptors on cultured thyroid cells. II Carbachol-induced desensitization. Molecular Pharmacology 21:73, 1982b.
- Chapman A.  
The relation to the thyroid and the pituitary gland to iodine metabolism. J. Endocrinol. 29:680, 1941.
- Chazenbalk G., Pisarev M., Juvenal G., Kleiman de Pisarev D., Meruri H., De Tomas M.  
Biosynthesis and regulation of lipid iodination in calf thyroid. Enviado para su publicación.



- Chazenbalk G., Kleiman de Pisarev D., Juvenal G., Pisarev M.  
Uptake, metabolism and subcellular distribution of  $^{125}\text{I}$ - $\text{T}_4$  in calf thyroid slices.  
Acta Endocrinológica (Kbh), en prensa.
- Chebath J., Chabaud O., Mauchamp J.  
Modulation of thyroglobulin messenger RNA level by thyrotropin in cultured thyroid cells. Nucleic Acids Research 6:3353, 1979.
- Chen Y., Shaw M., Payne A.  
Steroid and FSH action on LH receptors and LH sensitive testicular responsiveness during sexual maturation of the rat. Mol.Cell.Endocrinol. 8:291, 1977.
- Ching M., Schalch D., Lebda N.  
Role of growth hormone in the enhancement of the propylthiouracil-induced goitrogenesis by small doses of thyroxine.  
Acta Endocrinol. (Kbh) 79:238, 1975.
- Chopra I.  
A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. J.Clin.Endocrinol.Metab. 34:938, 1972.
- Chopra I.  
A study of extrathyroid conversion of thyroxine ( $\text{T}_4$ ) to 3, 3',5-triiodothyronine ( $\text{T}_3$ ) in vitro. Endocrinology 101:453, 1977.
- Chopra I.  
Nature, source and biological significance of thyroid hormones in blood. En:The Thyroid, 100, Harper y Row NY. 1978.

- Chopra I.  
New insights into metabolism of thyroid hormones: physiological and clinical implications. En: Physiopathology of Endocrine Diseases and Mechanisms of Hormone Action 67; Alan Liss, NY., 1981.
- Chopra I., Fisher D., Solomon D., Beall G.  
Thyroxine and triiodothyronine in the human thyroid. J.Clin. Endocrinol.Metab. 36:311, 1973.
- Chopra I., Williams D., Orgiazzi J., Solomon D.  
Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of reverse  $T_3$  and  $T_3$ . J.Clin. Endocrinol.Metab.41:911, 1975.
- Darney K., (Jr), Ewing L.  
Autoregulation of testosterone secretion in perfused rat testes. Endocrinology 109:993, 1981.
- Davies T., Taliadouros G., Catt K., Nisula B.  
Assessment of urinary thyrotropin-competing activity in choriocarcinoma and thyroid disease: further evidence for human chorionic gonadotropin interacting at the thyroid cell membrane. J.Clin.Endocrinol.Metab. 49:353, 1979.
- Decoster C., Van Sande J., Dumont J., Mockel J.  
Dissociation of cGMP accumulation and secretory inhibition in the action of carbamylcholine on thyroid. FEBS Letters 66:191, 1976.
- De Fronzo R., Binder C., Wahren J., Felig Ph, Ferranine E., Faber O.  
Sensitivity of insulin secretion to feedback inhibition by hyperinsulinaemia. Acta Endocrinol. (Kbh) 98:81, 1981.

- De Groot L.  
Current views on formation of thyroid hormone. N.Engl.J. Med. 272:243, 1965.
- De Groot L., Carvalho E.  
Iodide binding in thyroid cellular fractions. Jof Biol. Chem. 235:1390, 1960.
- De Groot L., Davis A.  
The early phase of thyroid hormone formation: studies in tissue slices. Endocrinology 69:683, 1961.
- De Groot L., Niepomnische H.  
Biosynthesis of thyroid hormone: Basic and clinical aspects. Metabolism 26:665, 1977.
- De Groot L., Rue P.  
 $T_3$  receptor occupancy and metabolic responses. J.Endocrinol. Invest. 2:183, 1979.
- De Groot L., Strausser J.  
Binding of  $T_3$  in rat liver nuclei. Endocrinology 95:74, 1974.
- Dekker A., Field J.  
Correlation of effects of TSH, prostaglandins and ions on glucose oxidation, cAMP and colloid droplet formation in dog thyroid slices. Metabolism 19:453, 1970.
- Delange F., Herselman J., Ermans A.  
Relationship between the serum thyrotropin level, the prevalence of goiter and the pattern of iodine metabolism in Idjwi Island. J.Clin. Endocrinol.Metab. 33:261, 1971.

- Delbauffe D., Paulovic-Hournac M.  
Hormonal Regulation of thyroidal protein phosphokinase activities. FEBS Letters 69:59, 1976.
- De Lean A., Ferland L., Drouin J., Kelly P., Labrie F.  
Modulation of the pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. Endocrinology 100:1496, 1977.
- De Prada M., Zürcher G.  
Simultaneous radio enzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomole range. Life Sciences 19:1161, 1976.
- De Robertis E., Mancini R.  
Ultrastructure and localization of labeled in the thyroid gland. En: Proceed. Colloquium on the thyroid, 149, Univ. de Brasil, 1961.
- De Robertis E., Nowinski W.  
The mechanism of the therapeutic effect of iodide on the thyroid gland. Science 103:421, 1946.
- De Robertis F., Nowinski W.  
The proteolytic activity of normal and pathological human thyroid tissue. J.Clin.Endocrinol.Metab. 6:235, 1946.
- Dhopeswarkar G., Mandlik M., Atmaram R., Mead J.  
Role of phospholipids in iodine binding. Proc.Soc.Exp.Biol. (NY) 129:571, 1968.
- Dickson J.  
Effects of thyrotropic hormone on thyroid cells in filter-well culture. Endocrinology 79:721, 1966.

- Dratman M.  
The mechanism of thyroxine action. En: Hormonal Proteins and Peptides, 205. Academic Press, NY, 1978.
- Duick D., Warren D., Nicoloff J., Otis C., Croxon M.  
Effect of single dose dexamethasone on the concentration of serum triiodothyronine in man. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39:1151, 1974.
- Dumas D., Charrier B., Margotat A., Mauchamp J.  
Modulation by catecholamines and thyrotrophin of cyclic AMP response to  $\beta$ -adrenergic stimulation by cultured porcine thyroid cells. J.Endocrinol. 93:1, 1982.
- Dumont J.,  
Effects in vitro de l'iodure et de la diiodotyrosine sur le shunt hexosemonophosphate thyroïdien. Compt.Rend.Soc. Biol. 155:2225, 1961.
- Dumont J.  
The action of thyrotropin in thyroid metabolism. Vitam. Horm. 29:287, 1971.
- Dumont J., Vassart G.  
Thyroid gland metabolism and the action of TSH. En:"Endocrinology", V1:311, Grunney Stratton, NY, 1980.
- Dumont J., Boeynaems J., Decoster C., Erneux C., Lamy F, Lecocq R., Mockel J., Unger J., Van Sande J. Biochemical mechanism in the control of thyroid function and growth. Adv. Cyclic Nucl.Res. 9:723, 1978.
- Dumont J., Boeynaems J., Van Sande J., Erneux C., Decoster C., Van Cauter C., Mockel J.  
cAMP, calcium and cGMP in the regulation of thyroid function. Horm.Cell.Regul. 1:171, 1977.

- Dumont J., Lamy F.  
The regulation of thyroid cell metabolism, function, growth and differentiation. En: "The Thyroid Gland" 153, Raven Press, N.York, 1980.
- Du Ruisseau J.  
Seasonal variations of PBI in healthy Montrealers. J.Clin. Endocrinol. Metab. 25:1513, 1965.
- Eberhardt N., Valcana T., Timiras P.  
Triiodothyronine nuclear receptors: An in vitro comparison of the binding of triiodothyronine to nuclei of adult rat liver, cerebral hemisphere and anterior pituitary. Endocrinology 102:556, 1978.
- Ekholm R.  
Iodination of thyroglobulin: an intracellular or extracellular process. Molec. Cell. Endocrinol. 24:141, 1981.
- Emmelin N., Trendelenburg U.  
Degeneration activity after parasympathetic or sympathetic denervation. Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol. 66:148, 1972.
- Engbring N., Engstrom W.  
Effects of estrogen and testosterone on circulating thyroid hormone. J.Clin. Endocrinol. Metab. 19:783, 1959.
- Engler H., Taurog A., Dorris M.  
Preferential inhibition of thyroxine and 3,5,3' triiodothyronine formation by PTU and MMI in thyroid peroxidase catalyzed iodination of thyroglobulin. Endocrinology 110:190, 1982.

- Enriori C.  
Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA., 1962.
- Ericsson L., Melander A., Owman Ch., Sundler F.  
Endocytosis of thyroglobulin and release of thyroid hormone in mice by catecholamines and 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology* 87:915, 1970.
- Ericsson L.  
Exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell. *Molec.Cell.Endocrinol.* 22:1, 1981.
- Erneux C., Van Sande J., Dumont J., Boeynaems J.  
Cyclic nucleotide hydrolysis in the thyroid gland. *Eur. J.Biochem.* 72:137, 1977.
- Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G.  
The effect of propylthiouracil, methylthiouracil on the peripheral metabolism of L-Thyroxine in thyroidectomized, L-thyroxine maintained rats. *Endocrinology* 69:456, 1961.
- Falck B., Mchedlishvili G., Owman C.  
Histochemical demonstration of adrenergic nerves cortex-pia of rabbit. *Acta Pharmac.Tox.* 23:133, 1965.
- Falconer J.  
The effect of adrenaline and noradrenaline on hormone secretion and blood flow from the thyroid vein in sheep with exteriorized thyroids. *J.Physiol.* 188:425, 1967.
- Fawcett D.  
The formation of sulfenyl iodides as intermediates during the in vitro iodination of tyrosine by calf thyroid homogenates. *Canad.J. Biochem.* 46:1433, 1968.

- Fenzi G., Bartalena L., Macchia F., Monzani F., Checchi M.  
Interference of thyroglobulin in TSAb detection by radioreceptor assay. J.Endocrinol.Invest. 2:221, 1979.
- Ferguson J. (Jr), Morita Y., Mendelsohn L.  
Incorporation in vitro of precursors into protein and RNA of rat adrenal glands. Endocrinology 80:521, 1967.
- Field J.  
Pituitary thyrotropin=mechanism of action. En:The Thyroid, 185; Harper y Row NY., 1978.
- Field J., Bloom G., Chow C., Kerins M.  
Inhibition of thyroid stimulating hormone stimulation of protein kinase, glucose oxidation and phospholipid synthesis in thyroid slices previously exposed to the hormone. J.Clin. Invest. 59:659, 1977.
- Field J., Bloom G., Kerins M.  
Activation of protein kinase in thyroid slices by thyroid stimulating hormone. J.Biol. Chem. 250:4903, 1975.
- Field J., Dekker A., Bloom G., Kerins M., Frumess R.  
In vivo and in vitro refractoriness to thyrotropin stimulation of iodine organification and thyroid hormone secretion. J.Clin.Invest. 64:265, 1979.
- Field J., Pastan I., Johnson P., Herring B.  
Stimulation in vitro of pathways of glucose oxidation in thyroid stimulating hormone. J.Biol.Chem. 235:1863, 1960.
- Friedman Y., Lang M., Burke Y.  
Further characterization of bovine thyroid prostaglandin synthase. B.BActa 397:231, 1975.



- Friedman Y., Levasseur S., Burke G.  
Demonstration of a thyrotropin-responsive prostaglandin  $E_2$ -9-ketoreductase in bovine thyroid. B.B.Acta 431:615, 1976.
- Friedman Y., Lang M., Burke G.  
Inhibition of thyroidal cyclic AMP-dependent protein kinase by thyroid hormone. Endocrinol.Res.Comm. 5:109, 1978.
- Friedman Y., Lang M., Levasseur S., Burke G.  
Demonstration of a tonic regulatory thyropin effect on thyroid function. Endocrinology 104:467, 1979.
- Gafni M., Sirkis N., Gross J.  
Inhibition of the response of mouse thyroid to thyrotropin induced by chronic triiodothyronine treatment. Endocrinology 97:1256, 1975.
- Galli-Mainini C.  
Effect of thyroid and thyrotropic hormones upon oxygen consumption ( $QO_2$ ) of the thyroid of the goinea pig. Endocrinology 29:674, 1941.
- Galton V.  
Thyroid hormone-catecholamines interrelation ships. Endocrinology 77:278, 1975.
- Galton V., Pitt Rivers R.  
The effect of excessive iodine on the thyroid of the rat. Endocrinology 64:835, 1959.

- Gerard C., Haye B., Jacquemin C.  
Effects of arachidonate on cultured pig thyroid cell and their stimulation by thyrotropin. FEBS Letters 132:23, 1981.
- Gerard C., Haye B., Jacquemin C., Mauchamp J.  
Chronic and acute effects of thyrotropin on phosphatidylinositol turnover in cultured porcine thyroid cells. B.B.Acta 710:359, 1982.
- Gibori G., Keyes P.  
Role of intraluteral estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy. Endocrinology 102:1176, 1983.
- Gibori G., Keyes P., Richard J.  
A role for intraluteral estrogen in the mediation of luteinizing hormone action in the rat corpus luteum during pregnancy. Endocrinology 103:162, 1978.
- Glowacka D., Stelemach H., Jaroszewicz L.  
Effect of iodide on glucose, N-acetylglucosamine and leucine incorporation into acid-insoluble fraction of pig thyroid proteins in vitro. Endocrinol.Exp. 15:163, 1981.
- Goglia F., Torresani J., Bugli P., Barletta A., Liverini G.  
In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria. Pflügers Archiv. 390:120, 1981.
- Goglia F., Torresani J., Bugli P., Barletta A., Liverini G.  
In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria. Pflügers Archiv. 390:120, 1981.

- Goldenheim P., Amir S., Uchimura H., Ingbar S.  
Studies of the binding of thyroid hormones and their short loop feed back effects in bovine thyroid tissue. Endocrinology 105:1308, 1979.
- Goldman H.  
The nervous control of blood flow to the pineal body. Life Sciences 6:2071, 1967.
- Goldman H., Nikitovich-Winer, M.  
Rapid flow of blood through pituitary autografts in the rat. Am.J.Physiol. 217:567, 1969.
- Goldsmith R., Eiselle M.  
The effect of iodide on the release of thyroid hormone in hyperthyroidism. J.Clin.Endocrinol.Metab. 16:130, 1956.
- Goldsmith R., Herbert C., Lutsch G.  
The effect of iodine on the release of thyroid hormone in hyperthyroidism. J.Clin.Endocrinol.Metab. 18:367, 1958.
- Gorbman A.  
En comparative Endocrinology, 99, Wiley, NY., 1967.
- Granner D., Curtis S., Scrauten J., Halmi N.  
Differences in thyroid function between triiodothyronine treated and hypophysectomized rats: binding glands. Endocrinology 72:100, 1963.
- Green W.  
Further studies of the effects of inorganic iodide on thyroidal intermediary metabolism in vitro. Endocrinology 79:1, 1966.

- Green W.  
Relationship between the effects of iodide, methimazole and thyrotropin on the intermediary metabolism of bovine thyroid slices. Endocrinology 86:706, 1970.
- Green W.  
Metabolism of thyroid hormones by rat thyroid tissue in vitro. Endocrinology 103:826, 1978.
- Green W.  
Mechanisms of action of antithyroid compounds. En: The Thyroid, 77; Harper y Row. NY., 1978.
- Green W., Ingbar S.  
The effect of iodide on the rate of release of  $^{131}\text{I}$  from autonomous thyroid nodules. J.Clin.Invest. 41:173, 1962.
- Green W., Ingbar S.  
Effects of inorganic iodide on the intermediary carbohydrate metabolism of surviving sheep thyroid slices. J. of Clin. Investig. 42:11, 1963.
- Greer M., De Groot L.  
The effect of stable iodide on thyroid secretion in man. Metabolism 5:682, 1956.
- Gregerman R., Davis P.  
Intrinsic physiologic variables and nonthyroid illness. En: The Thyroid, 223; Harper y Row, NY., 1978.
- Häggendal J.  
The disappearance of dopamine- $\beta$ -hydroxylase from the rat salivary glands after extirpation of the superior cervical ganglion. J. Neural. Transm. 48:249, 1980.

- Haibach H.  
Evidence for a thyroxine deiodinating mechanism in the rat different from iodothyrosine deiodinase. *Endocrinology* 88:918, 1971a.
- Haibach H.  
Fate of perfused iodothyronines in rat thyroid. *Metabolism* 20:819, 1971b.
- Halmi N.  
Regulation of the rat thyroid in short-term iodine deficiency. *Endocrinology* 54:216, 1954.
- Halmi N., Granner D., Doughman D., Peters B., Müller G.  
Biphasic effect of TSH on thyroidal iodide concentrations in rats. *Endocrinology* 67:70, 1960.
- Halmi N., Pitt Rivers R.  
The iodide pools of the rat thyroid. *Endocrinology* 70:660, 1962.
- Halmi N., Spirtos B.  
Analysis of the action of propylthiouracil on the pituitary-thyroid axis of rats. *Endocrinology* 55:613, 1954.
- Halmi N., Spirtos B.  
Analysis of the modifying effect of dietary iodine levels on the thyroidal response of hypophysectomized rats to thyrotropin. *Endocrinology* 56:157, 1955.
- Halmi N., Spirtos B., Bogdanove E., Lipner H.  
A study of various influences on the iodide concentrating mechanisms of the rat thyroid. *Endocrinology* 52:19, 1953.

- Halmi N., Stuelke R.  
Problems of thyroidal self regulation. Metabolism 5:646, 1956.
- Harada A., Hershman J., Reed A., Braunstein G., Dignam W., Derzko C., Friedman S., Jewelewicz R., Pekary A.  
Comparison of thyroid stimulators and thyroid hormone concentrations in the sera of pregnant women. J.Clin.Endocrinol. Metab. 48:793, 1979.
- Hashizume K., Akasu F., Takazawa K., Endo W., Onaya T.  
The inhibitory effect of acute administration of excess iodine on the formation of adenosine 3'-5' monophosphate induced by thyrotropin in mouse thyroid lobes. Endocrinology 99:1463, 1976.
- Hashizume K., Fenzi G., De Groot L.  
Thyroglobulin inhibition of thyrotropin binding to thyroid plasma membrane. J.Clin.Endocrinol.Metab. 46:679, 1978.
- Haye B., Champion S., Jacquemin C.  
Existence of two pools of prostaglandins during stimulation of the thyroid by TSH. FEBS Letters 41:89, 1974.
- Haye B., Gerard C., Jacquemin C.  
Effects of eicosatetraenoic acid (ETYA) on cultured pig thyroid cells. FEBS Letters 148:281, 1982.
- Haye B., Jacquemin C.  
Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ] arachidonate in pig thyroid lipids and prostaglandins. B.B.Acta 487:231, 1977.
- Hays M.  
Effect of epinephrine on radiiodine uptake by the normal human thyroid. J.Clin.Endocrinol.Metab. 25:465, 1965.

- Henninger R., Albright E.  
Effect of iodine on iodine containing compounds of rat tissues. Endocrinology 79:309, 1969.
- Hershman J.  
Placental thyroid stimulators and thyroid function in pregnancy. En Fetal Endocrinology, 141, Academic Press, 1981.
- Heywood S.  
The regulation of aminoacid incorporation into thyroid protein:evidence that thyroxine and iodide inhibit protein synthesis at a ribosomal site. B.B.Acta 123:188,1966.
- Hökfelt T., Hellström C., Efendic S., Johansson O., Luft R., Arimura A.  
Immunohistochemical evidence for a wide-spread occurrence of somatostatin in neurosecretory cells, primary sensory neurons and endocrine-like cell systems. Acta Endocrinol. (Kbh) Suppl 199:134, 1975.
- Holmes S., Titus G., Chow M., Field J.  
Effect of TSH and cholera toxin on the thyroid adenylate cyclase-cAMP system. Endocrinology 107:2076, 1980.
- Hong S., Levine L.  
Inhibition of arachidonic acid release from cells as the biochemical action of anti-inflammatory corticosteroids. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA), 73:1730, 1976.
- Hulbert A.  
The thyroid hormones:a thesis concerning their action. J.Theor.Biol. 73, 81; 1978.

- Hupka S., Dumont J.  
In vitro effect of adrenaline and other amines on glucose metabolism in sheep thyroid, heart, liver, kidney and testicular slices. Biochem. Pharmacol. 12:1023, 1963.
- Igarashi Y., Kondo Y.  
Acute effect of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles. B.B.Res.Comm. 97:759, 1980a.
- Igarashi Y., Kondo Y.  
Demonstration and characterization of partial glyceride specific lipases in pig thyroid plasma membranes. B.B.Res. Commun. 97:766, 1980b.
- Igarashi Y., Kondo Y.  
Transient increase in prostaglandin production as an acute response of thyroid isolated follicles to thyrotropin. B.B.Res.Comm. 99:1045, 1981.
- Ilno S., Yamada T., Greer M.  
Effect of graded doses of propylthiouracil on biosynthesis of thyroid hormones. Endocrinology 68:582, 1961.
- Incolla J.  
El bocio: cretinismo endémico. Rev. de Obras Sanitarias de la Nación 163:474, 1955.
- Ingbar S.  
Autoregulation of the thyroid. Response to iodide excess and depletion. Mayo Clin.Proc. 47:814, 1972.
- Ingbar S.  
Effects of iodine:autoregulation of the thyroid. En:The Thyroid, 206; Harper y Row, NY., 1978.



- Ingbar S., Freinkel N.  
Regulation of the perip-heral metabolism of the thyroid hormones. Rec.Prog.Horm.Res. 16:353, 1960.
- Ingbar S., Segal J.  
Observations in support of the hypothesis that thyroid hormones act at the level of the cellular plasma membranes. En Tiroides 82, 33, Ed.Med.Panam.,Bs.As., 1982.
- Jacquemin C., Haye B.  
Action de la TSH sur le métabolisme des phospholipides thyroïdiens in vitro. Effect biphasique non reproduit par c-AMP et dbc-AMP. Bull.Soc.Chim.Biol. 52:153, 1970.
- Jarret R., Field J.  
A comparison of the effects of thyrotrophin and sodium iodide on the oxidation of glucose-1-<sup>14</sup>C and the levels of triphosphopyridine nucleotides in thyroid slices from several species. Endocrinology 75:711, 1964.
- Joasoo A., Murray I.  
The effect of epineprine on the uptake of <sup>131</sup>I by the rat thyroid, with particular reference to the trapping process. Acta Endocrinol. (Kbh) 77:35, 1974a.
- Joasoo A., Murray I.  
The effect of epinephrine on thyroid hormone synthesis in the rat. Acta Endocrinol. (Kbh) 77:43, 1974b.
- Joasoo A., Murray I.  
Receptors mediating epinephrine effect on thyroid <sup>131</sup>I-uptake and thyroxine synthesis in the rat. Acta Endocrinol. (Kbh) 79:259, 1975.

- Jolin T., Morreale de Escobar G., Escobar del Rey, F.  
Differential effects in the rat of thyroidectomy, propyl-thiouracil and other goitrogens on plasma insulin and thyroid weight. Endocrinology 87:99, 1970.
  
- Jolin T., Tarin M. García M.  
Induction of goitre by PTU or  $KClO_4$  in male and female rats. Effect of gonadectomy. Acta Endocrinol. (Kbh) 74: 88, 1973.
  
- Jolin T., Tarin M., García M.  
Effect of adrenalectomy and corticosterone on thyroid weight of goitrogen-treated rats. Role of adrenal-corticoids in the insulin increase of goitre weight. Acta Endocrinol. (Kbh) 75:734, 1974.
  
- Jonkheer M., Coomans D., Broeckeaert I., Van Paepegem R., Deconinck F.  
Seasonal variation of stable intrathyroid iodine in non toxic goiter disclosed by X-ray fluorescence. J.Endocrinol Invest. 5:27, 1982.
  
- Jorgensen E., Murray W.  
Thyroxine analogs. 22. Thyromimetic activity of halogen-free derivatives of 3,5-dimethyl-1-thyronine. J.of Med. Chemistry 17:434, 1974.
  
- Juvenal G., Kleiman de Pisarev D., Crenovich L., Pisarev M.  
Role of neurotransmitters, prostaglandins and glucose on precursor incorporation into the RNA of thyroid slices. Acta Endocrinol. (Kbh) 87:776, 1978.

- Kaneko T., Eor U., Field J.  
Thyroid-stimulating hormone and prostaglandin E<sub>1</sub> stimulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in thyroid slices. Science 165:1062, 1969.
- Katakai S., Yamada T., Shichijo K.  
Effect of excess iodide on thyroid hormone synthesis in hypophysectomized, thyrotropin administered rats. Metabol. 15:3, 1966.
- Keitel H., Sherer M.  
Marked depression of the plasma protein-bound iodine concentration in the absence of clinical hypothyroidism during testosterone medication. J.Clin.Endocrinol.Metab. 17:854, 1957.
- Kenimer J., Hershman J., Higgins H.  
The thyrotropin in hydatidiform moles is human chorionic gonadotropin. J.Clin.Endocrinol.Metab. 40:482, 1975.
- Kielczynski W., Nauman J.  
Inhibition of thyrotropin binding to human thyroid plasma membranes by thyroid hormones and "reverse triiodothyronine. B.B.Res.Comm. 82:811, 1978.
- Kleiman de Pisarev D., Pisarev M., Juvenal G.  
Action of KI and several iodocompounds on <sup>3</sup>H-uridine incorporation into thyroid RNA. Acta Endocrinol. (Kbh), 89:316, 1978.
- Kleiman de Pisarev D., Pisarev M., Spaulding S.  
Early effects of TSH on RNA polymerase activity in the dog thyroid. Endocrinology 104:634, 1979.

- Knopp J., Stole V., Tong W.  
Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with thyroid stimulating hormone or dibutyryl cyclic adenosine 3',5' monophosphate. J.Biol. Chem. 245:4403, 1970.
- Koerner D., Schwartz H., Surks M., Oppenheimer J., Jorgensen E..  
Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nucleic. High correlation of selected between structural requirements for nuclear binding and biological activities. J.Biol.Chem. 250:6417, 1975.
- Konno N.  
Reciprocal changes in serum concentration of triiodothyronine and reverse triiodothyronine between summer and winter in normal adult men. Endocrinol. Japon, 27:471, 1980.
- Kotani M., Kariya T., Field J.  
Studies of thyroid stimulating hormone binding to bovine thyroid plasma membranes. Metabolism. 24:959, 1975.
- Kuszack J., Rodin A.  
A new technique of pinealectomy for adult rat. Experientia 33:283, 1977.
- Lamas L., Couvreur M., Obregon M., Hove-Vandenbroucke M.  
Effect of chronic iodide supplements on thyroid secretion: the role of Lysosomes. Endocrinology 110:1804, 1982.
- Lamas L., Dorris M., Taurog A.  
Evidence for a catalytic role for thyroid peroxidase in the conversion of diiodotyrosine to thyroxine. Endocrinology 90:1417, 1972.
- Lamy F., Rodesch F., Dumont J.  
Action of thyrotropin on thyroid energetic metabolism VI-

Regulation of mitochondrial respiration. Exp.Cell.Res.  
46:518, 1967.

- Lamy F., Willems C., Lecocq R., Delcroix C., Dumont J.  
Stimulation by thyrotropin in vitro of uridine incorporation into the RNA of thyroid slices. Horm.Metab.Res.  
3:414, 1971.
- Larsen P., Dick T., Markovitz B., Kaplan M., Gard T.  
Inhibition of intrapituitary thyroxine to 3,5,3'-triiodo-  
thyronine in pituitary conversion prevents the acute  
suppression of thyrotropin release by thyroxine in hy-  
pothyroid rats. J.Clin.Invest. 64:117, 1979.
- Larsen P., Silva E., Kaplan M.  
Relation ships between circulating and intracellular thy-  
roid hormones: Physiological and clinical implications.  
Endocrine Reviews 2:87, 1981.
- Larsen P., Yamashita K., Dekker A., Field J.  
Biochemical observations in functioning human thyroid ade-  
nomas. J.Clin.Endocrinol.Metab. 36:1009, 1973.
- Latner A., Cook D., Solanki K.  
Inhibition of binding of corticotropin-(1-24)-tetracosapep-  
tide (Synacthen) to membrane receptors of adrenal cortex  
by cortisol. Biochem J. 164:477, 1977.
- Lecocq R., Dumont J.  
Stimulation by thyrotropin aminoacid incorporation into  
proteins in dog thyroid slices in vitro. B.B.Acta 281:434,  
1972.

- Leonard J., Rosenberg I.  
Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. Endocrinology 103:2137, 1978.
  
- Levey G., Roth J., Pastan I.  
Effects of propranolol and phentolamine on canine and bovine responses to TSH. Endocrinology 84:1009, 1969.
  
- Lewitus Z., Hasenfratz J., Toor M., Massry S., Rabinowitch E.  
<sup>131</sup>I uptake studies under hot climatic conditions. J.Clin. Endocrinol.Metab. 24:1084, 1964.
  
- Lindsay R., Cash A., Hill J.  
TSH stimulation of orotic acid conversion to pyrimidine nucleotides and RNA in bovine thyroid. Endocrinology 84:534, 1969.
  
- Lindvall M., Edvinsson L., Owman C.  
Sympathetic nervous control of cerebrospinal fluid production from the choroid plexus. Science 201:176, 1978.
  
- Lissitzky S., Fayet G., Giraud A.  
Thyroid stimulating hormone binding to cultured thyroid cells. FEBS Letters 29:20, 1973.
  
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193:265, 1951.
  
- Maayan M.  
TSH and catecholamines: independent effects on active transport and iodine organification in isolated thyroid cells. Acta Endocrinol. (Kbh) 86:763, 1977.

- Maayan M., Debons A., Krinsky I., Volpert E., From A., Dawry F., Siclary E.  
Inhibition of thyrotropin and dibutyryl c-AMP induced secretion of thyroxine and triiodotyronine by catecholamines. Endocrinology 101:284, 1977a.
- Maayan M., De bons A., Volpert E., Krinsky I.  
Catecholamines inhibition of thyrotropin-induced secretion of thyroxine:mediation by an  $\alpha$ -adrenergic receptor. Metabolism 26:473, 1977b.
- Maayan M., Ingbar S.  
Epinephrine: effect on uptake of iodine by dispersed cells of calf thyroid gland. Science 162:124, 1968.
- Maayan M., Ingbar S.  
Effects of epinephrine on iodine and intermediary metabolism in isolated thyroid cells. Endocrinology 87:588, 1970a.
- Maayan M., Ingbar S.  
Acute depletion of thyroid ATP and pyridine nucleotides following injection of iodine in the rat. Endocrinology 86:83, 1970b.
- Maayan M., Shapiro R., Ingbar S.  
Epinephrine precursors: effects on the iodine and intermediary metabolism of isolated calf thyroid cells. Endocrinology 92:912, 1973.
- Maayan M., Volpert E., From A.  
Norepinephrine and thyrotropin effects on the thyroid in vitro: simultaneous stimulation of iodide organification of thyroxine release. Endocrinology 109:930, 1981.

- Macchia V., Varrone S.  
Mechanism of TSH action, studies with dibutyryl cyclic AMP and dibutyryl cyclic GMP. FEBS Letters 13:342, 1971.
- Madovi S., Rappaport L., Nuñez J.  
Prostaglandins and in vitro TSH-dependent iodide binding by rat thyroid glands. Biochimic 56:109, 1974.
- Marshall N., Von Borcke S., Ekins R.  
Independence of  $\beta$ -adrenergic and thyrotropin receptors linked to adenylate cyclase in the thyroid. Nature 261:603, 1976.
- Marshall N., Von Borke S., Malan P.  
Studies on isoproterenol stimulation of adenyl cyclase in membrane preparations from the bovine thyroid. Endocrinology 96:1520, 1975.
- Mashiter K., Mashiter G., Field J.  
Effect of prostaglandin  $E_1$ , ethand and TSH on the adenylate cyclase activity of beef thyroid plasma membranes and cyclic AMP content of dog thyroid slices. Endocrinology 94:370, 1974.
- Masini Repiso A., Coleoni A.  
Effect of epinephrine and 5-hydroxytryptamine on in vitro thyroid iodine organification. Acta Endocrinol. (Kbh), 97:207, 1981.
- Matovinovic J., Vickery A.  
Relation of nucleic acids to the structure and function of the guinea pig thyroid gland. Endocrinology 64:149, 1959.
- Matsukawa S., Hosoya T.



Process of iodination of thyroglobulin and its maturation.  
J. Biochem. 85:1009, 1979.

- Matsuzaki S., Kakegawa T., Suzuki M., Hamana K.  
Thyroid function and polyamines III. Changes in ornithine decarboxylase activity and polyamine contents in the rat thyroid during hyperplasia and involution. Endocrinol. Japon. 25:129, 1978.
- Mattila J., Männistö P.  
Studies on the role of the pineal gland in the regulation of TSH secretion in postpuberal male rats. Hormone Res. 14: 24, 1981.
- Mauchamp J., Nunez J., Roche J.  
Sur le lipides iodés de la glande thyroïde et leur participation éventuelle à l'hormonogénèse. C.R.Soc.Biol. (Paris) 157:961, 1963.
- Mc Caman R.  
Microdetermination of catechol-O-methyl transferase in brain. Life Sciences 4:2353, 1965.
- Medeiros Neto G., Nicolau W., Takeda A., Ulhoa Cintra A.  
Effect of iodized oil on iodine content, thyroglobulin maturation and on biochemical constituents of endemic goiter in Brazil. Acta Endocrinol. (Kbh) 79:439, 1975.
- Melander A.  
Amines and mouse thyroid activity: release of thyroid hormone by catecholamines and indoleamines and its inhibition by adrenergic blocking drugs. Acta Endocrinol. (Kbh) 65:371, 1970.

- Melander A.  
Sympathetic nervous-adrenal medullary system. En:the thyroid, 216; Harper y Row, NY., 1978.
- Melander A-, Ericsson L., Ljunggren J.  
Synpathetic innervation of the normal human thyroid. J. Clin.Endocrinol.Metab. 39:713, 1974a.
- Melander A., Ericsson L., Sundler F.  
Sympathetic regulation of thyroid hormone secretion. Life Sciences 14:237, 1974c.
- Melander A., Ericsson L., Sundler F., Ingbar S.  
Sympathetic innervation of the mouse thyroid and its significance in thyroid hormone secretion. Endocrinology 94:959, 1974b.
- Melander A., Nilsson E., Sundler F.  
Sympathetic activation of thyroid hormone secretion in mice. Endocrinology 90:194, 1972.
- Melander A., Owman Ch., Sundler F.  
TSH induced appearance and stimulation of amine containing mast cells in the mouse thyroid. Endocrinology 89:528, 1971
- Melander A., Rankler E., Sundler F., Westergren U.  
Beta<sub>2</sub>-adrenergic stimulation of thyroid hormone secretion. Endocrinology 97:332, 1975b.
- Melander A., Sundler F.  
Interactions between catecholamines 5-hidroxytryptamine and TSH on the secretion of thyroid hormone. Endocrinology 90:188, 1972.

- Melander A., Sundler F.  
Presence and influence of cholinergic nerves in the mouse thyroid. Endocrinology 105:7, 1979.
- Melander A., Sundler F., Westergren U.  
Intrathyroidal amines and the synthesis of thyroid hormone. Endocrinology 93:193, 1973.
- Melander A., Sundler F., Westergren U.  
Sympathetic innervation of the thyroid: variation with species and age. Endocrinology 96:102, 1975a.
- Melander A., Westergren U., Ericsson L., Sundler F.  
Influence of the sympathetic nervous system on the secretion and metabolism of thyroid hormone. Endocrinology 101:1228, 1977.
- Meldolesi M., Fishman P., Aloj S., Kohn L., Brady R.  
Relationship of gangliosides to the structure and function of thyrotropin receptors: their absence on plasma membranes of a thyroid tumor defective in thyrotropin receptor activity. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73:4060, 1976.
- Mockel J., Decaux G., Unger J., Dumont J.  
In vitro regulation of ornithine decarboxylase in dog thyroid slices. Endocrinology 107:2069, 1980.
- Monaco F., Robbins J.  
Incorporation of N-acetylmannosamine and N-acetylglucosamine into thyroglobulin in rat thyroid in vitro. J. Biol. Chem. 248:2072, 1973.

- Money W., Neltzer R., Feldman D., Rawson R.  
The effects of various thyroxine analogues on suppression of  $^{131}\text{I}$  uptake by the rat thyroid. Endocrinology 64:123, 1959.
- Monley S., Bourke J., Hawker R.  
Reversible binding of labelled and non labelled thyrotropin by intact thyroid tissue in vitro. J.Endocrinol. 54:387, 1972.
- Moore W., Wolff J.  
Binding of prostaglandin  $\text{E}_1$  to beef thyroid membranes. J.Biol.Chem. 248:5705, 1973.
- Moore W., Wolff J.  
Thyroid-stimulating hormone binding to beef thyroid membranes. J.Biol.Chem. 249:6255, 1974.
- Morgan W., Hansen J.  
Time course of the disappearance of pineal noredrenaline following superior cervical ganglionectomy. Exp.Brain. Res. 32:429, 1978.
- Morishige W., Guernsey.  
Triiodothyronine receptors in rat lung. Endocrinology 102:1628, 1978.
- Morley J.  
Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. Endocrine Reviews 2:396, 1981.

- Morton M., Chaikoff J., Rosenfeld S.  
Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation  
in vitro of thyroxine and diiodothyrosine by surviving  
thyroid slices. J.Biol.Chem. 154:381, 1944.
- Mouriz J., Morreale de Escobar G., Escobar del Rey, F.  
Mechanism of the suppression by iodide of the thyroidal  
 $^{131}\text{I}$  release rate in the rat. Endocrinology 79:757, 1966.
- Mowbray J., Peart W.  
Effects of noradrenaline and adrenaline on the thyroid.  
J.Physiol. 151:261, 1960.
- Mullin B., Fishman P., Lee G., Aloj S., Ledley F., Winand  
R., Kohn L., Brady R.  
Thyrotropin-ganglioside interaction and their relationship  
to the structure and function of thyrotropin receptors.  
Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 73:842, 1976.
- Munro H., Fleck A.  
The determination of nucleic acids. En:Methods of bioche-  
mical analysis 14:113; Jon Wiley and Sons, NY., 1966.
- Murthy P., Mc Kenzie J.  
Changes in thyroid ribonucleic acid ribonucleases and al-  
kaline ribonuclease inhibitor. Endocrinology 94:74, 1974.
- Nadler N., Leblond C.  
The site and rate of the formation of thyroid hormone.  
Brook haven Symp.Biol. 7:40, 1955.

- Naeije R., Vanhaelst L., Goldstein J.  
Pituitary-thyroid axis during short term, mild and severe iodine depletion in the rat. Horm.Metab.Res. 10:521, 1978.
- Nagasaka A., Hidaka H.  
Human thyroid cyclic phosphodiesterase. Its characterization and the effects of several hormones on the activity. B.B.Acta 438:449, 1976.
- Nagataki S.  
Effect of excess quantities of iodide. En:Handbook of Physiology, sect 7; Endocrinology V.3:329, American Physiological Society, Washington, 1974.
- Nagataki S., Ingbar S.  
Relation between qualitative and quantitative alterations in thyroid hormone synthesis induced by varying doses of iodide. Endocrinology 74:731, 1964.
- Nagataki S., Shizume K., Nakao K.  
Effect of chronic graded doses of iodide on thyroid hormone synthesis. Endocrinology 79:667, 1966.
- Nagataki S., Uchimura H., Masayama Y., Nakao K., Ito K.  
Triiodothyronine and thyroxine in thyroid glands of euthyroid japanese subjects. J.Clin.Endocrinol.Metab. 35:18,1972
- Nakagawa H., Endo Y., Ohtaki S.  
Stimulation of protein-bound iodine formation by lipid extracts from hog thyroid microsomes. Endocrinol.Japon, 28:409, 1981.

- Narang G., Singh D., Turner C.  
Effect of melatonin on thyroid hormone secretion rate and feed consumption of female rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125:184, 1967.
- Nataf B., Chaicoff J.  
The effect of insulin on iodine metabolism of fetal thyroid glands in organ culture. B.B. Acta III:422, 1965.
- Nataf B., Imbenotte J., Friede J., Marel J.  
Comparative effects of TSH and of insulin on fetal rat thyroid gland maintained in organ culture (36595). Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. 140:986, 1972.
- Nir I., Hirschmann N., Puder M., Petrank J.  
Changes in rodent thyroid hormones and cyclic AMP following treatment with pineal indolic compounds. Arch. Int. Physiol. Biochim. 86:353, 1978.
- Nisula B., Morgan F., Canfield R.  
Evidence that chorionic gonadotropin has intrinsic thyrotropic activity. B.B. Res. Commun 59:86, 1974.
- Nisula B., Taliadouros G.  
Thyroid function in gestational trophoblastic neoplasia: evidence that the thyrotropic activity of chorionic gonadotropin mediates the thyrotoxicosis of choriocarcinoma. An. J. of Obst. and Gynec. 138:77, 1980.
- Nunez J., Pommier J.  
Formation of thyroid hormones. Vitam. and hormones 39:175, 1982.

- Obregon M., Pascual A., Mallol J., Morreale de Escobar G., Escobar del Rey F.  
Evidence against a major role of l-thyroxine at the pituitary level: studies in rats treated with iopanoic acid (telepaque). Endocrinology 106:1827, 1980.
- Ochi G., De Groot L.  
TSH or LATS-stimulated thyroid hormone release is inhibited by iodide. Endocrinology 84:1305, 1969.
- Odell W., Bates R., Rivlin R., Lipsett M., Hertz R.  
Increased thyroid function without clinical hyperthyroidism in patients with choriocarcinoma. J.Clin.Endocrinol. Metab. 23:658, 1963.
- Ogata E., Yoshitoshi Y., Nishiki N., Kobayashi S.  
Dual effects of iodide IV: on reduced pyridine nucleotides in rabbit thyroid in situ: iodide induces oxidation and prevents oxidative response to TSH. Endocrinology 90:169, 1972.
- Ohtake M., Sato A., Onaya T., Yamada T.  
Effect of repeated administration of excess iodide on thyroid hormone secretion in rats, with special reference to the escape from the iodide effect. Endocrinology 93:343, 1973.
- Onaya T., Halmi N.  
Mechanism of the inhibitory effect of iodide on thyroidal  $^{131}\text{I}$  release in the rat. Endocrinology 81:643, 1967.
- Onaya T., Solomon D.  
Stimulation by prostaglandin  $\text{E}_1$  of endocytosis and glucose oxidation in canine thyroid slices. Endocrinology 86: 423, 1970.



- Onaya T., Tomizawa T., Yamada T., Shichijo K.  
Further studies on the inhibitory effect of excess iodide on thyroidal hormone release in the rat. *Endocrinology* 79:138, 1966.
- Oppenheimer J.  
Initiation of thyroid-hormone action. *N.Engl.J.Med.* 292:1063, 1975.
- Oppenheimer J., Koerner D., Schwartz H., Surks M.  
Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 35:330, 1972.
- Oppenheimer J., Surks M.  
Quantitative aspects of hormone production distribution metabolism and activity. *En:Hand book of Physiology*, sect. 7, Endocrinology, V3:Thyroid, 197, American Physiological Society, Washington, 1974.
- Otsuki M., Dakoda M., Baba S.  
Influence of glucocorticoids on TRF-induced TSH response in man. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 36:95, 1975.
- Panda J., Turner C.  
The role of melatonin in the regulation of thyrotrophin secretion. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 57:363, 1968.
- Pastan I., Herring B., Johnson P., Field J.  
Stimulation in vitro of glucose, oxidation in thyroid by acetylcholine. *J.Biol.Chem.* 236:340, 1961.

- Pawlikowski M., Konert-Radek J., Mróz-Wasilewska Z.  
Biphasic inhibitory and stimulatory effects of thyrotropin on the mitotic activity of thyroid explants cultured in vitro. *Endokrinologie* 73:186, 1979.
- Pekonen F., Weintraub B.  
Interactions of crude and pure chorionic gonadotropin with the thyrotropin receptor. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 50:28, 1980.
- Péron F., Moncloa F., Dorfman R.  
Studies on the possible inhibitory effect of corticosterone on corticosteroidogenesis at the adrenal level in the rat. *Endocrinology* 67:379, 1960.
- Perrone M., Hinkle P.  
Regulation of pituitary receptors for thyrotrophin-releasing hormone by thyroid hormone. *J.Biol.Chem.* 253:5168, 1978.
- Pethes G., Losoncay S., Rudas P.  
Interrelation ship of serum thyroxine concentration with age and seasonal changes in growing bulls. *Acta Veterinaria (Beograd)* 29:89, 1979.
- Pauler J., Johnson G.  
Simultaneous single isotopes radioenzymatic assay of plasma norepinephrine and dopamine. *Life Sciences* 21:625, 1977.
- Pisarev M., Aiello L.  
Studies on the mechanism of action of KI on thyroid protein biosynthesis. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 82:298, 1976.

- Pisarev M., Aiello L., Kleiman de Pisarev D.  
Action of KI, thyroxine and cyclic AMP on <sup>3</sup>H-uridine incorporation into thyroid RNA. Acta Endocrinol. (Kbh) 89: 316, 1978.
- Pisarev M., Altschuler N.  
Action of KI on thyroid acid protease. Acta Endocrinol.(Kbh) 74:703, 1973.
- Pisarev M., De Groot L., Hati R.  
KI and imidazole, inhibition of TSH and cyclic AMP-induced thyroidal iodine secretion. Endocrinology 88:1217, 1971.
- Pisarev M., De Groot L., Wilber J.  
Cyclic AMP production of goiter. Endocrinology 87:339, 1970.
- Pisarev M., De Groot L., Wilber J., Altschuler N.  
Action of cyclic guanosine monophosphate on thyroid weight and protein. Endocrinology 88:1074, 1971.
- Pisarev M., Itoiz M.  
Action of KI on stimulated thyroid protein biosynthesis. Endocrinology 90:1409, 1972.
- Pisarev M., Kleiman de Pisarev. D.  
Action of cyclic nucleotides on protein and RNA synthesis in the thyroid. Acta Endocrinológica (Kbh) 84:297, 1977.
- Pisarev M., Kleiman de Pisarev D.  
Biochemistry of thyroid regulation under normal and abnormal conditions. J.Endocrinol. Invest. 3:217, 1980.

- Pisarev M., Spaulding S.  
Increased DNA accessibility and enhanced RNA transcription following TSH stimulation of thyroid slices. VIII Int. Thyroid Congress. Abst. 105, Australia, 1980.
- Pisarev M., Utiger R., Salvaneschi J., Altschuler N., De Groot L.  
Serum TSH and thyroxine in goitrous subjects in Argentina. J.Clin.Endocrinol. Metab. 30:680, 1970b.
- Pitt-Rivers R.  
The thyroid hormones: historical aspects. En: Hormonal Proteins and Peptides V.6, 392, Acad.Press., NY., 1978.
- Pliam N., Goldfine I.  
High affinity thyroid hormones binding sites on purified rat liver plasma membranes. B.B.Res. Commun 79:166, 1977.
- Pochet R., Boeynaems J., Dumont J.  
Stimulation by TSH of horse thyroid plasma membranes adenylate cyclase: evidence of cooperativity. B.B.Res.Commun 58:446, 1974.
- Pochet R., Van Sande J., Erneux C., Dumont J.  
Inhibition of thyroid adenylate cyclase by iodide. FEBS Lett. 83:33, 1977.
- Posner I., Ordoñez L.  
Lipid-iodine association in the rat thyroid gland. B.B. Acta 187:588, 1969.

- Purvis K., Clausen O., Hansson V.  
Androgen effects on rat Leydig cells. Biol.Reprod.  
20:304, 1979.
- Raben M.  
The paradoxical effects of thiocyanate and of thyrotropin on the organic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide. Endocrinology 45:296, 1949.
- Raghupathy E., Abraham S., Kerkof P., Chaikoff L.  
Some characteristics of the sheep thyroid gland system for incorporating amino acids into protein. Endocrinology 74:468, 1964.
- Ramey J., Burrow G., Spaulding S., Donabedian R., Speroff L., Frantz A.  
The effect of aspirin and indomethacin on the TRH response in man. J.Clin.Endocrinol.Metab. 43:107, 1976.
- Rapoport B., Adams R.  
Induction of refractoriness to thyrotropin stimulation in culture thyroid cells: dependence on new protein synthesis. J.Biol.Chem. 251:6653, 1976.
- Rapoport B., West M., Ingbar S.  
Inhibitory effect of dietary iodine on the thyroid adenylate cyclase response to thyrotropin in the hypophysectomized rat. J.Clin. Invest. 56:516, 1975.
- Rapoport B., West M., Ingbar S.  
On the mechanism of inhibition by iodide of the thyroid adenylate cyclase response to thyrotropic hormone. Endocrinology 99:11, 1976.

- Rappaport A., Ohira S., Coddling J., Empey G., Kalnins A., Lin B., Haist R.  
Effects of insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas. Endocrinology 91:168, 1972.
- Relkin R.  
Effect of pinealectomy and constant light and darkness on thyrotropin levels in the pituitary and plasma of the rat. Neuroendocrinology 10:46, 1972.
- Relkin R.  
Use of melatonin and synthetic TRH to determine site of pineal inhibition of TSH secretion. Neuroendocrinology 25:310, 1978.
- Robbins J., Rall J.  
Hormone transport in circulation: the interaction of thyroid hormones and proteins in biological fluids. Recent. Prog.Horm.Res. 13:161, 1957.
- Roche J., Michel R., Michel O., Lissitzky S.  
Sur la déshalogenation enzymatique des iodotyrosines par le corps thyroïde et sur son rôle. B.B.Acta 9:161, 1952.
- Rodesch F., Neve P., Willems C., Dumont J.  
Stimulation of thyroid metabolism by thyrotropin, cyclic 3'5' AMP, dibutyryl cyclic 3'5' AMP and prostaglandins E<sub>1</sub>. Eur. J.Biochem 8:26, 1969.

- Rotella C., Tanini A., Zonefrati R., Toccafondi R.  
Interaction between iodothyronines and thyrotropin receptors in human cultured thyroid cells. J.Recept. Research 2:367, 1981-82.
- Rousset B., Poncet C., Dumont J., Mornex R.  
Intracellular and extracellular sites of iodination in dispersed hog thyroid cells. Biochem.J. 192:801, 1980.
- Saddok C., Gafni M., Gross J.  
Effect of iodide on the adenyl cyclase system of the mouse thyroid in vivo. Acta Endocrinol. (Kbh) 88:517, 1978.
- Santo H., Kanazawa Y., Kuzuya T.  
Effect of bonito insulin on endogenous insulin secretion in dogs. Am.J.Physiol. 218:1357, 1970.
- Sato A., Hashizume K., Onaya T., Miyakawa M., Makiuchi M., Furihata R.  
Effects of biogenic amines on the formation of adenosine 3',5'-monophosphate in human thyroid slices. Endocrinol. Jap6n 23:319, 1976.
- Sato S., Szabo B., Kowalsky K., Burke G.  
Role of prostaglandin in thyrotropin action on thyroid. Endocrinology 90:343, 1972.
- Scatchard G.  
The attraction of proteins to small molecules and ions. Ann., NY., Acad.Sci. 51:660, 1949.

- Scott T., Freinkel N., Klein J., Nitzan M.  
Metabolism of phospholipids, neutral lipids and carbohydrates in dispersed porcine thyroid cells; comparative effects of pituitary thyrotropin and dibutyryl 3',5' adenosine monophosphate on the turnover of individual phospholipids in isolated cells and slices from pig thyroid. *Endocrinology* 87:5, 1970.
  
- Schwartz H., Oppenheimer J.  
Nuclear triiodothyronine receptor sites in brain: probable identify with hepatic receptors and regional distribution. *Endocrinology* 103:267, 1978a.
  
- Schwartz H., Oppenheimer J.  
Ontogenesis of 3,5,3'-triiodothyronine receptors in neonatal rat brain: dissociation between receptor, concentration and stimulation of oxygen consumption by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology* 103:943, 1978b.
  
- Schneider P., Wolff J.  
Thyroidal iodide transport IV on a possible role for iodide-binding phospholipids. *B.B.Acta* 94:114, 1965.
  
- Schultz G., Hardman J., Schultz K., Barid C., Sutherland E.  
The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate levels. *Proc.Nat.Acad. Sci. (USA)* 70:3889, 1973.
  
- Segal J., Ingbar S.  
Stimulation by triiodothyronine of the in vitro uptake of sugars by rat thymocytes. *J.Clin.Invest.* 63:1172,1979.



- Serif G., Kirkood S.  
The mechanism of the antithyroid action of iodide ion.  
Endocrinology 58:23, 1956.
- Service J., Nelson R., Rubinstein A., Go V.  
Direct effect of insulin on secretion of insulin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide and gastrin during maintenance of normoglycemia. J.Clin. Endocrinol. Metab. 47:488, 1978.
- Shah D., Shownkeen R., Thakare U.  
Iodinated thyrolipids. Acta Endocrinol. (Kbh) 70:683, 1972.
- Shah D., Thakare U., Shownkeen R., Pahuja D., Mandlick E.  
Iodinated thyrolipids: their possible role in hormonogenesis. Acta Endocrinol. (Kbh) 74:461, 1973.
- Shenkman L., Imai I., Kataoka K., Hollander C.  
Prostaglandins stimulate thyroid function in pregnant women. Science 184:81, 1974.
- Sherwin J.  
Iodide induced suppression of the thyrotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production in cat thyroid slices. Horm. Research 9:271, 1978.
- Sherwin J., Mills J.  
Epinephrine inhibits thyrotropin stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cat thyroid tissue. Endocrinology 106:28, 1980.

- Sherwin J., Tong W.  
The action of iodide and TSH on thyroid cells showing a dual control system for the iodide pump. *Endocrinology* 94:1465, 1974.
  
- Sherwin J., Tong W.  
Thyroid autoregulation. Iodide induced suppression of thyrotropin-stimulated cyclic AMP production and iodinating activity in thyroid cells. *B.B.Acta* 404:30, 1975.
  
- Shima K., Morishita S., Sawazaki N., Tanaka R.  
Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man. *Horm.Metab.Res.* 9:441, 1977.
  
- Shimizu T., Shishiba Y.  
Effect of triiodothyronine or iodide on the thyroidal secretion in vitro: inhibition of TSH and dibutyryl cyclic AMP induced endocytosis. *Endocrinol. Japon.* 22:55, 1975.
  
- Shimoda S., Greer M.  
Stimulation of in vitro iodothyronine synthesis in thyroid lobes from rats given a low iodine diet, propylthiouracil or TSH in vivo. *Endocrinology* 78:715, 1966.
  
- Shinozawa T., Abe Y., Kawi S., Arikawa K., Oshima H., Suzuki Y., Saito E., Ichikawa Y., Homman M.  
The effect of thyroglobulin on TSH receptor-adenylate cyclase system in human thyroid tissue. *Proceed.of the Eighth International Thyroid Congress.* 743. Sydney, Australia, 1980.

- Shishiba Y., Takaishi M., Miyachi Y., Ozawa Y.  
Alteration of thyroidal responsiveness to TSH under the influence of circulating thyroid hormone: short feed back regulatory effect. *Endocrinol.Jap.* 22:367, 1975.
- Shuman S., Zor U., Chayeth R., Field J.  
Exposure of thyroid slices to thyroid stimulating hormones induces refractoriness of the cAMP system to subsequent hormone stimulation. *J.Clin.Invest.* 57:1132, 1976.
- Silva E., Astier H., Thakare U., Schwartz H., Oppenheimer, J.  
Partial purification of the triiodothyronine receptor from rat liver nuclei. *J.of Biol.Chem.* 252:6799, 1977.
- Silva J., Larsen P.  
Contributions of plasma triiodothyronine to nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver and kidney of hypothyroid rats. *J.Clin. Invest.* 61:1247, 1978.
- Siverberg J., O'Donnell J., Sugenoya A., Row V., Volpe R.  
Effect of human chorionic gonadotropin on human thyroid tissue in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 46:420, 1978.
- Singh V., Chaikoff J.  
Effects of 1-methyl-2-mercaptoimidazole and perchlorate on the insulin-mediated enhancement of  $^{131}\text{I}$  incorporation into iodoaminoacids by fetal thyroid glands in organ culture. *Endocrinology* 78:339, 1966.
- Singh V., Nataf B., Chaikoff I.  
The effect of insulin on the formation of protein and ribonucleic acid by fetal rat thyroid glands in organ culture. *Life Sciences* 4:1603, 1965.

- Sluszkiewicz E., Pawlikowski M.  
Suppression of thyroid proliferative response to exogenous TSH by prostaglandin synthesis inhibitors. Endocrinol. Exp. 14:227, 1980.
- Smith D., Robbins J., Rall J.  
Iodine containing subcellular particles in thyroid tissue. Endocrinology 69:510, 1961.
- Shedecor Y., Cochran W.  
Statistical Methods. Iowa state University Press, Ames 1967.
- Socolow E., Dunlap D., Sobel R., Ingbar S.  
A correlative study of the effect of iodine administration on thyroidal iodide and organic iodine content. Endocrinology 83:737, 1968.
- Spaulding S.  
Nitrogenous compounds reversibly inhibit the adenosine 3'-5'-monophosphate response to thyrotropin: this effect is dissociated from altered guanine 3'-5'-monophosphate levels. Endocrinology 105:697, 1979.
- Spaulding S., Burrow G.  
Several adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases in the thyroid. Endocrinology 91:1343, 1972.
- Spaulding S., Burrow G.  
TSH regulation of cAMP dependent protein kinase activity in the thyroid. B.B.Res. Commun 59:386, 1974.

- Spaulding S., Burrow G.  
Effect of PGE<sub>1</sub> and TSH on cAMP-dependent protein kinase activity in the thyroid. Endocrinology 96:1018, 1975.
- Spaulding S., Burrow G.  
 $\beta$  - adrenergic stimulation of cAMP and protein kinase activity in the thyroid. Nature 254:347, 1975.
- Spira O., Birkenfeld A., Avni A., Gross J., Gordon A.  
TSH synthesis and release in the thyreidectomized rat effect of T<sub>3</sub>. Acta Endocrinol. (Kbh) 92:502, 1979.
- Spiro R., Spiro M.  
The carbohydrate composition of the thyroglobulins from several especies. J.Biol.Chem. 240:997, 1965.
- Starling J., Hopps B.  
Effect of excess iodine on thyroidal and liver lysosomal enzymes. J.Surgical Research 28:57, 1980.
- Stefano F., Perec C., Tumilasci O.  
Changes in neural uptake and metabolism of and sensitivity to norepinephrine during the degeneration secretion in the rat submaxillary gland. J.Pharmac.Exp.Ther. 191:403, 1974.
- Sterling K.  
Thyroid hormone action at the cell level. N.Engl.J.Med. 300:117 & 173, 1979.
- Sterling K., Dharmgrongartama B., Brenner M., Sakurada T.  
Specific mitochondrial binding sites for triiodothyronine. Trans.Assoc.Am.Physicians 92:334, 1979.

- Sterling K., Lazarus J.  
The thyroid and its control. Ann.Rev.Physiol.39:349,1977.
- Sterling K., Lazarus J., Milch P., Sakurada T., Brenner M.  
Mitochondrial thyroid hormone receptor: localization and physiological significance. Science 201:1126, 1978.
- Studer H., Greer M.  
The regulation of thyroid function in iodine deficiency. Hans Huber Publ.Bern. 1968.
- Studer H., Kohler H., Bürgi H.  
Iodine deficiency. En: Handbook of Physiology, section 7, Endocrinology, V.3; Thyroid p.303. American Physiological Society, Washington, 1974.
- Takasu N., Sato S., Tsukui T., Yamada T., Furihata R., Marucchi M.  
Inhibitory action of thyroid hormone on the activation of adenyl-cyclase-cyclic AMP system by thyroid stimulating hormone in human thyroid tissue from euthyroid and thyrotoxic patients. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39:772, 1974.
- Takeuchi K., Suzuki H., Sawada M., Horiuchi Y.  
Effect of excessive iodide administration on the proteolytic activity of the thyroid gland. Endocrinology 86: 1239, 1970.
- Taliadouros G., Canfield R., Nisula B.  
Thyroid-stimulating activity of chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. J.Clin.Endocrinol.Metab. 47: 855, 1978.

- Tanaka K., Inada M., Ishii H., Naito K., Nishikawa M., Mashio Y., Imura H.  
Inner ring monodeiodination of thyroxine and 3,5,3'-< - triiodothyronine in rat brain. Endocrinology 109:1619, 1981.
- Tanini A., Toccafondi R., Aterini S., Rotella C., Zonefrati E.  
Interaction between thyroglobulin and thyrotrophin receptor in cultured thyroid cells. Ital. J.Biochem. 30:168, 1981.
- Taurog A.  
Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. Recent. Progr.Horm.Res. 26:189, 1970.
- Taurog A.  
The mechanism of action of the thioureyline antithyroid drugs. Endocrinology 98:1031, 1976.
- Taurog A.  
Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. En:The Thyroid, 31; Harper y Row, NY., 1978.
- Taurog A., Tong W., Chaikoff I.  
An unidentified iodine compound formed by incubation of cell-free preparations of tissue with iodide-<sup>131</sup>I. J.Biol.Chem. 227:759, 1957.
- Taurog A., Tong W., Chaikoff J.  
Thyroid <sup>131</sup>I- metabolism in the absence of the pituitary: the untreated, hypophysectomized rat. Endocrinology 62: 646, 1958.

- Thanki K., Channing C.  
Effects of follicle-stimulating hormone and estradiol upon progesterone secretion by porcine granulosa cells in tissue culture. Endocrinology 103:74, 1978.
- Tong W.  
In vitro effects of thyrotropin on certain metabolic activities of isolated thyroid cells. Endocrinology 75:527, 1964.
- Tong W.  
Thyrotropin stimulation of thyroxine synthesis in isolated thyroid cells treated with puromycin. Endocrinology 76:163, 1965.
- Tong W.  
TSH stimulation of  $^{14}\text{C}$  amino acid incorporation in protein by isolated bovine thyroid cells. Endocrinology 80:1101, 1967.
- Tong W., Kerkof P., Chaikoff J.  
Iodine metabolism of dispersed cells obtained by trypsinization of sheep thyroid glands. B.B.Acta 60:1, 1962.
- Tonove T., Tong W., Stolc V.  
TSH and dibutyryl-cyclic-AMP stimulation of hormone release from rat thyroid glands in vitro. Endocrinology 87:271, 1970.
- Uchimura H., Amir S., Ingbar S.  
Failure of organic iodine enrichment to influence the binding of bovine thyrotropin to rat thyroid tissue. Endocrinology 104:1207, 1979.



- Uchimura H., Cheng Chiu S., Kuzaya N., Ikeda H., Ito K., Nagataki S.  
Effect of iodine enrichment in vitro on the adenylate cyclase-adenosine 3'-5' monophosphate system in thyroid glands from normal subjects and patients with Graves' disease. J.Clin. Endocrinol.Metab. 50:1066, 1980.
- Uzumaki H., Muraki T., Kato R.  
Involvement of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in stimulation of phosphatidylinositol metabolism by catecholamines in mouse thyroids. Biochem. Pharmacology 31:2237, 1982.
- Vacas M., Cardinali D.  
Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. Horm. Res. 13:121, 1980.
- Vagenakis A., Downs P., Braverman L., Ingbar S.  
Control of thyroid hormone secretion in normal subjects receiving iodide. J.Clin.Invest. 52:528, 1973.
- Vale W., Burgus R., Guillemin R.  
On the mechanism of action of TRF: effects of cycloheximide and actinomycin on the release of TSH stimulated in vitro by TRF and its inhibition by thyroxine. Neuroendocrinology 3:34, 1968.
- Vale W., Rivier C., Brazeau P., Guillemin R.  
Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. Endocrinology 95:968, 1974.
- Valenta L.  
Effect of iodide and thyrotropin on in vitro  $^{14}\text{C}$ -amino acid incorporation into rat thyroid proteins. Acta Endocrinol. (Kbh) 76:273, 1974.

- Valenta L., Florsheim W., Sharma B.  
Acute effects of iodine on the stimulated rat thyroid.  
Endocrinology 111:1721, 1982.
- Vanderlaan W., Caplan R.  
Observations on a relationship between total iodine content and the iodide-concentrating mechanism of the thyroid gland of the rat. Endocrinology 54:437, 1954.
- Vanderlaan W., Vanderlaan W., Logan M.  
Effect of administering TSH with and without iodide on thyroid tissue metabolism. Endocrinology 29:93, 1941.
- Van Herle A., Vassart G., Dumont J.  
Control of thyroglobulin synthesis and secretion. New Eng. J.Medicine 301:239, 1979.
- Van Sande J., Cochaux P., Decoster C., Mockel J., Boenaems J., Dumont J.  
Effects of prostaglandins  $E_x$  on dog thyroid cyclic AMP level and function. B.B.Acta 716:53, 1982.
- Van Sande J., De Coster C., Dumont J.  
Control and role of cGMP in the thyroid. B.B.Res. Commun 62:168, 1975a.
- Van Sande J., Decoster C., Dumont J.  
Effects of carbamylcholine and ionophore A23187 on cyclic 3',5'-AMP and cyclic 3',5'-GMP accumulation on dog thyroid slices. Molec.Cell.Endocr. 14:45, 1979.

- Van Sande J., Dumont J.  
Effects of thyrotropin, prostaglandin E<sub>1</sub> and iodide on cyclic 3',5'-AMP concentration in dog thyroid slices. B.B. Acta 313:320, 1973.
- Van Sande J., Dumont J., Melander A., Sundler F.  
Presence and influence of cholinergic Nerves in the human thyroid. J.Clin. Endocrinol.Metab. V-51:3, 1980.
- Van Sande J., Erneux C., Dumont J.  
Negative control of TSH action by iodide and acetylcholine:mechanism of action in intact cells. J.Cycl.Nucleot Res. 3:335, 1977.
- Van Sande J., Grenier G., Willems C., Dumont J.  
Inhibition by iodide of the activation of the thyroid cyclic 3'5' AMP system. Endocrinology 96:781, 1975b.
- Vassart G.  
Specific synthesis of thyroglobulin on membrane bound thyroid ribosomes. FEBS Letters 22:53, 1972.
- Verrier B., Mauchamp J., Lissitzky S.  
Modulation of adenylate cyclase activity by thyrotropin in cultured thyroid cells. Probable role of intracellular GTP. FEBS Letters 115:201, 1980.
- Verspohl E., Ammon H.  
Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans. J.Clin.Invest. 65:1230, 1980.
- Virion A., Pommier J., Nunez J.  
Dissociation of thyroglobulin iodination and hormone synthesis catalyzed by peroxidases. Eur.J.Biochem. 102: 549, 1979.

- Vitti P., De Wolf M., Acquaviva A., Epstein M., Kohn L.  
Thyrotropin stimulation of the ADP-ribosyltransferase activity of bovine thyroid membranes. Proc.Natl.Acad. Sci. (USA) 79:1525, 1982.
- Vriend J.  
Testing the hypothesis of pineal function. Medical Hypotheses 4:376, 1978.
- Vriend J.  
The pineal and melatonin in the regulation of pituitary thyroid axis. Life Sciences 29:1929, 1981.
- Vriend J., Hinkle P., Knigge K.  
Evidence for a TRH inhibitor in the pineal gland. Endocrinology 107:1791, 1980.
- Vriend J., Reiter R., Anedrseon G.  
Effects of the pineal and melatonin on thyroid activity of male golden hamsters. Gen.Comp.Endocr. 38:189, 1979.
- Vriend J., Richardson B., Vaughan M., Johnson L., Reiter R.  
Effects of melatonin on thyroid physiology of female hamsters. Neuroendocrinology 35:79, 1982.
- Wadeleux P., Winand R.  
Effect of thyrotropin on the properties of messenger RNA from cultured human thyroid cells. B.B.Acta 652:64, 1981.
- Wartofsky L., Ransil B., Ingbar S.  
Inhibition by iodide of the release of thyroxine from the thyroid glands of patients with thyrotoxicosis. J.Clin. Invest. 49:78, 1970.

- Weeke J., Hansen A., Lundaek A.  
Inhibition by somatostatin of basal levels of serum thyrotropin (TSH) in normal men. J.Clin.Endocrinol.Metab. 41:168, 1975.
  
- Whur P., Herscovics A., Leblond L.  
Radioiautographic visualization of the incorporation of galactose <sup>3</sup>H and mannose <sup>3</sup>H by rat thyroids in vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. J.Cell. Biol. 43:289, 1969.
  
- Wikholm G., Einhorn J.  
Effect of prednisolone and triiodothyronine on thyroid function in hyperthyroidism. J.Clin.Endocrinol.Metab. 23:76, 1963.
  
- Willems C., Rocmans P., Dumont J.  
Stimulation in vitro by thyrotropin, cyclic 3'5'AMP dibutyryl cyclic 3'5' AMP and prostaglandin E<sub>1</sub> of secretion by dog thyroid slices. B.B.Acta 222:474, 1970.
  
- Williams L., Lefkowitz R.  
Receptor Binding studies in Adrenergic Pharmacology. Raven Press, NY., 1978.
  
- Williams J., Malayan S.  
Effects of TSH on iodide transport by mouse thyroid lobes in vitro. Endocrinology 97:162, 1975.
  
- Wilson B., Raghupathy E., Tonove T., Tong W.  
TSH-like actions of dbcAMP on isolated bovine thyroid cells. Endocrinology 83:877, 1968.

- Winand R., Wadeleux P., Etienne-Decerf J., Kohn L.  
Biochemical basis of thyroid stimulation in using thyroid cells in tissue culture. En:"Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone actions". 1, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1976.
- Wolff J.  
Iodide goiter and the pharmacologic effects of excess iodide. Am.J.Med. 47:101, 1969.
- Wolff J.  
Iodide concentrating mechanism. En:"The thyroid and biogenic amines". North Holland Publ., Amsterdam, 115, 1972.
- Wolff J.  
Iodide homeostasis. En:"Regulation of thyroid Function". 65, Schattauer Verlag, Stuttgart, 1976.
- Wolff J.  
Physiological aspects of iodide excess in relation to radiation protection. Journal Molec.Med. 4:151, 1980.
- Wolff J., Chaikoff J.  
The inhibitory action of iodide upon organic binding of iodine by the normal thyroid gland. J.Biol.Chem. 172:855, 1948a.
- Wolff J., Chaikoff J.  
Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. J.Biol.Chem. 174:555, 1948b.

- Wolff J., Chaikoff J.  
The inhibitory action of excess iodide upon the synthesis of diiodothyrosine and of thyroxine in the thyroid of the normal rat. Endocrinology 43:174, 1948c.
- Wolff J., Chaikoff J.  
Plasma inorganic iodide a chemical regulator of normal thyroid function. Endocrinology 42:468, 1948d.
- Wolff J., Chaikoff J., Goldberg R., Meier J.  
The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodine synthesis in the normal thyroid. Endocrinology 45:504, 1949.
- Wolff J., Halmi N.  
Thyroidal iodide transport. V The role of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  activated ouabain sensitive adenosine trisphosphatase activity. J.Biol.Chem. 238:847, 1963.
- Wolff J., Hope Cook G.  
Activation of thyroid membrane adenylate cyclase by purine nucleotides. J.Biol.Chem. 248:350, 1973.
- Wolff J., Moore W.  
The effect of indomethacin on the response of thyroid tissue to thyrotropin. B.B.Res.Commun 51:34, 1973.
- Wollman S., Reed F.  
Acute effect of organic binding of iodine on the iodide concentrating mechanism of the thyroid gland. Am.J. Physiol. 194:28, 1958.

- Wu S.  
Thyrotropin mediated induction of thyroidal iodothyronine monodeiodinases in the dog. Endocrinology 112:417, 1983.
- Wurtman R.  
Biogenic amines and endocrine function. Fed.Proceed. 32: 1769, 1973.
- Yagura T., Walfish P.  
A new unextracted-sample radioimmunoassay method for hepatic endogenous nuclear L-triiodothyronine content. Biochem J. 208:641, 1982.
- Yamada T., Iino S., Hichijo K.  
Inhibitory effect of excess iodide on thyroidal radiiodine release in the rat. Endocrinology 72:83, 1963.
- Yamada T., Lewis A.  
Studies on the mechanism of the inhibitory action of excess iodide on the release of radioiodine from the rat thyroid gland. Endocrinology 82:54, 1968.
- Yamamoto K., De Groot L.  
Affinity chromatography of thyroid peroxidase using tyrosine coupled to agarose. J.Biochem. 91:775, 1982.
- Yamamoto M., Herman E., Rapaport B.  
Prostaglandin generation in vitro by peripheral blood mononuclear cells in co-culture with human thyroid cells. J.Biol.Chem. 254:4046, 1979.
- Yamamoto K., Onaya T., Yamada T., Kotani M.  
Inhibitory effect of excess iodide on thyroid hormone release as measured by intracellular colloid droplets. Endocrinology 90:986, 1972.



- Yamashita K., Bloom G., Rainard B., Zor U., Field J.  
Effects of chlorpromazine, propranolol and phospholipase C on thyrotropin and prostaglandin stimulation of adenylylcy-clase-cyclic AMP system in dog thyroid slices. Metabolism 19:1109, 1970.
- Yamashita K., Field J.  
Elevation of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in dog thyroid slices caused by acetylcholine and sodium fluoride. J.Biol.Chem. 247:7062, 1972.
- Yamashita K., Yamashita S., Aiyoshi Y.  
Effects of  $\alpha_2$ -adrenergic action on cAMP levels in canine thyroid slices. Life Sciences 27:1127, 1980.
- Yamashita K., Yamashita S., Ogata E.  
Regulation of cyclic AMP levels in canine thyroid slices by  $\alpha$ -adrenergic action. Life Sciences 21:607, 1977.
- Yamashita K., Yamashita S., Ogata E.  
 $\alpha$ -adrenergic interaction with stimulators of cAMP concentra-tions in canine thyroid slices. Life Sciences 24:563, 1979.
- Yu S., Friedman Y., Richman R., Burke G.  
Altered thyroidal responsivity to thyrotrop in induced by circulating thyroid hormones. A "short loop" regulatory mechanism. J.Clin. Invest. 57:745, 1976.
- Yukimura Y., Ikejiri K., Kojima A., Yamada T.  
Effect of excess iodide and other anions on thyroid hormo-ne secretion in normal or hypophysectomized rats treated with graded doses of thyroid hormone. Endocrinology 99:541, 1976.

- Zacur H., Mitch W., Tyson J., Ostrow P., Foster G.  
Autoregulation of rat pituitary prolactin secretion demonstrated by a new perfusion method. Am.J.Physiol. 242:226, 1982.
- Zak B., Willard H., Myers G., Boyle A.  
Chloric acid method for determination of protein-bound iodine. Anal.Chem. 24:1345, 1952.
- Zaninovich A., Boado R., Ulloa E., Bromage N., Matty A.  
Inhibition of thyroidal iodine release by oestrogens in euthyroid subjects. Acta Endocrinológica (Kbh) 99:386, 1982.
- Zor U., Kaneko T., Lowe I., Bloom G., Field J.  
Effect of thyroid-stimulating hormone and prostaglandins on thyroid adenyl cyclase activation and cyclic adenosine 3',5' monophosphate. J.Biol.Chem. 244:5189, 1969a.
- Zor U., Bloom G., Lowe I., Field J.  
Effects of theophylline, prostaglandin E<sub>1</sub>, and adrenergic blocking agents on TSH stimulation of thyroid intermediary metabolism. Endocrinology 84:1082, 1969b.

